



Titre: Caractérisation physico-chimique, au niveau nanométrique, des surfaces de biomatériaux utilisés pour la délivrance de médicaments et pour la croissance osseuse
Title:

Auteur: Rodrigo de Oliveira França
Author:

Date: 2014

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: França, R. O. (2014). Caractérisation physico-chimique, au niveau nanométrique, des surfaces de biomatériaux utilisés pour la délivrance de médicaments et pour la croissance osseuse [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal].
Citation: PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/1643/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1643/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'hocine Yahia, & Edward Sacher
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE, AU NIVEAU
NANOMÉTRIQUE, DES SURFACES DE BIOMATÉRIAUX UTILISÉS POUR
LA DÉLIVRANCE DE MÉDICAMENTS ET POUR LA CROISSANCE
OSSEUSE

RODRIGO DE OLIVEIRA FRANÇA
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE, AU NIVEAU NANOMÉTRIQUE, DES
SURFACES DE BIOMATÉRIAUX UTILISÉS POUR LA DÉLIVRANCE DE
MÉDICAMENTS ET POUR LA CROISSANCE OSSEUSE

présentée par : FRANÇA Rodrigo de Oliveira

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. YELON Arthur, Ph. D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. SACHER Edward, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. ZHU Julian X, Ph. D., membre

M. SIAJ Mohamed, Ph. D., membre externe

DÉDICACE

À ma chère Rachel, par son amour inconditionnel

À mes enfants Miguel, Talita et Olivia

REMERCIEMENTS

À Dieu qui m'a donné la force pour réaliser ce rêve.

Je tiens à remercier plusieurs personnes qui ont collaboré à la réalisation de cette thèse.

Plus particulièrement mon directeur de recherche, Dr. L'Hocine Yahia, pour son excellente supervision. Je serai toujours reconnaissant pour la confiance qu'il m'a accordée.

Aussi, je tiens également à remercier mon codirecteur de recherche, Dr. Edward Sacher, par sa grande disponibilité et ses encouragements tout au long de ce projet.

Mes sincères remerciements aux professeurs du programme de Génie Biomédical, en spécial à son directeur Dr Pierre Savard. Aux professeurs et chercheurs qui ont beaucoup aidé à ma formation dans ce projet : Prof. Mateescu et Prof. Le Tien de l'UQAM, Dr Veres et Dr Zhang de l'IMI et un chaleureux merci à Mme. Suzie Poulin du LASM.

Aussi, mes vifs remerciements aux collègues du LIAB, notamment à Doris Mbeh par son amitié et à Dr. Taraneh Samani par son aide au long de ce projet.

« La reconnaissance est la mémoire du coeur. »

[Hans Christian Andersen]

RÉSUMÉ

Le développement de la nanotechnologie pour la délivrance de médicament a connu une croissance exponentielle au cours des dernières décennies. Les biomatériaux utilisés, en particulier les nanoparticules, suscitent un engouement particulier de chercheurs venant de plusieurs domaines de science, comme les chimistes, les biologistes, les ingénieurs, etc. Le point commun parmi toutes ces expertises est le besoin de minimiser les problèmes de toxicité de ces biomatériaux. Même si la littérature montre présentement une faible toxicité des nanoparticules, les résultats non satisfaisants sont encore liés aux processus de la synthèse et de la fonctionnalisation.

Il faut préciser que la principale différence entre un biomatériau et un autre matériau utilisé en génie est son potentiel d'interagir avec un organisme vivant, sans cause préjudicielle. Ce potentiel de biocompatibilité d'un biomatériau dépend de plusieurs paramètres, comme la composition de la surface, la taille, la forme, la charge, etc. La littérature montre divers méthodes, avec des équipements à la fine pointe, pour caractériser chacun de ces paramètres. Cependant, il est important de faire distinction entre la composition physicochimique d'un biomatériau et la composition physicochimique de sa surface, surtout à l'échelle nanométrique, car c'est au niveau des premières couches d'atomes que toutes les réactions d'interaction biomatériau / cellules se produisent. Cela veut dire que la composition physicochimique de la nano-surface joue un rôle majeur dans le contrôle de la biocompatibilité. Notamment, dans le cas de nanoparticules, l'adsorption de biomolécules et de protéines à la surface (effet couronne) a apporté de nouvelles questions à l'étude de la nanotoxicologie.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier les nano-surfaces de biomatériaux de taille nano- et micrométrique, qui sont utilisées pour la délivrance de médicaments. Dans le cadre de ce projet, nous avons axé nos recherches sur trois types de biomatériaux : nanoparticules superparamagnétiques, microsphères polymériques de chitosane et microparticules de biocéramiques hydroxyapatite, phosphate tricalcique beta et phosphate de calcium biphasique.

La production de nanoparticules superparamagnétiques pour la délivrance de médicaments doit être faite avec un degré élevé de reproductibilité, afin que la composition et les propriétés de la surface du dispositif médical soient toujours identiques. Pour cette raison, dans la première étude, nous avons analysé la reproductibilité de la physicochimie de surface pendant la fabrication de trois types de nanoparticules : oxyde de fer revêtu par l'acide oléique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$), oxyde de fer enrobé de l'oxyde de silicium ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) et par l'oxyde de silicium enrobé de silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$). Comme résultat, nous avons constaté que la surface de nanoparticules montrait des variations chimiques d'un lot à un autre. Il n'y avait aucune reproductibilité entre même deux lots de nanoparticules. Pas en un était trouvé à avoir la même chimie de surface; parmi les variations chimiques, nous avons observé une scission inattendue de la liaison Si-O et une oxydation de l'amine.

L'utilisation des nanoparticules chargées de médicaments exige, par fois, un biomatériau porteur pour les transporter jusqu' aux tissus ciblés. Un biomatériaux employés comme transporteur est le chitosane, un polymère naturel. Nous avons étudié, alors, l'effet de la stérilisation, par l'oxyde d'éthylène, sur la surface de quatre types de chitosane. Selon les résultats, il y a eu une modification physicochimique de la nano-surface, produite pendant le processus de stérilisation. Cette modification a apporté aussi de changements aux résultats toxicologiques. Même si tous les échantillons se sont révélés être biocompatibles et non toxiques avant et après la stérilisation, la viabilité des cellules a changée après la stérilisation.

Le troisième groupe de biomatériaux étudié était les biocéramiques de phosphates de calcium, tels que l'hydroxyapatite de calcium, de calcium biphasique et β -tricalcique. Ces biocéramiques sont utilisées comme échafaudage pour les cellules de l'os et peuvent aussi avoir des agents thérapeutiques associés à la surface pour favoriser la croissance osseuse. Comme pour les autres biomatériaux analysés dans ce projet de recherche, les échantillons de biocéramiques ont été caractérisés par spectroscopie de photoélectrons rayons X, diffraction des rayons X, la microscopie électronique à balayage, infrarouge à transformée de Fourier, la spectroscopie de masse d'ions secondaires à temps de vol et la granulométrie laser. Les résultats de la

caractérisation, au niveau nanométrique de la surface, ont montré que les rapports Ca / P et O / Ca dans les couches externes de l'ensemble des échantillons sont différents de ceux attendus.

Finalement, l'étude de la nano-surface de trois groupes de biomatériaux a démontré l'efficacité des méthodes de caractérisation quantitative, comme la spectroscopie de photoélectrons rayons X, comparées aux méthodes qualitatives comme infrarouge à transformée de Fourier. Aussi, après avoir fait la corrélation entre la caractérisation de surface et les résultats de tests toxicologiques, et faire aussi une analyse de la littérature disponible, nous avons conclu que, pour minimiser les résultats non satisfaisants de tests *in-vitro* ou *in-vivo* des biomatériaux pour la délivrance de médicament, il est très importante d'avoir une compréhension plus approfondie de la physicochimie des premières couches d'atomes de la surface.

ABSTRACT

The development of nanotechnology for drug delivery has seen an exponential growth in recent decades. The biomaterials used, in particular nanoparticles, are studied by researchers from various scientific fields, such as chemists, biologists, engineers, etc. The common aim of all these expertise working together is the need to minimize the problems of toxicity of these biomaterials. Although the literature shows a low toxic potential of nanoparticles, no satisfactory results, when found, are due to problems in the processes of synthesis and functionalization.

It is important to notice that the main difference between a biomaterial and other material used in engineering is its potential to interact with living organisms, without causing injury. This potential biocompatibility depends on several parameters, such as surface composition, size, shape, charge, etc. The literature discusses various methods, using advanced equipment, to characterize each of these parameters. However, it is important to make a distinction between the physicochemical composition of a biomaterial and the physicochemical composition of its surface, especially at the nanometer scale, because it is in the first layers of atoms that all interactions between biomaterials and cells will occur. This means that the physicochemical composition of the nanosurface plays a major role in controlling biocompatibility. Particularly in the case of nanoparticles, biomolecule and protein adsorption onto the surface (corona effect) brought new issues to the study of nanotoxicology.

The overall objective of this thesis is to study the nanosurface of biomaterials having nano- or micrometric dimensions, which are used for drug delivery. In this project we focused our research on three types of biomaterials: superparamagnetic nanoparticles, polymeric microspheres of chitosan and microparticles of bioceramics including hydroxyapatite, beta tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate.

The production of superparamagnetic nanoparticles for drug delivery must be made with a high degree of reproducibility, so that the composition and properties of the surface of the medical device are always the same. For this reason, in a first study, we analyzed the reproducibility of the physicochemical surface during the production of three types of nanoparticles: iron oxide-coated by oleic acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OA}$), iron oxide coated by silicon oxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$) and by silicon oxide plus silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{@NH}_2$). As result, we found that nanoparticle surfaces showed batch-to-batch chemical variations. There was no reproducibility between even two nanoparticle batches. Among the differences, there were unexpected alterations including cleavage of Si-O bond and the oxidation of the amine.

The use of nanoparticles loaded with drugs requires a biomaterial carrier to transport up to the targeted tissue. One biomaterials used as carrier is chitosan, a natural polymer. We studied the effect of ethylene oxide sterilization on the surface of four types of chitosan. The sterilization process caused a change in the physicochemical of the surface. This change produced changes to the toxicological results. Although all samples were found to be non-toxic and biocompatible, before and after sterilization, the cell viability was changed after sterilization with ethylene oxide.

The third biomaterial group studied was calcium phosphate bioceramics, such as calcium hydroxyapatite, biphasic calcium phosphate and β -tricalcium phosphate. These bioceramics are used as scaffold for bone cells and also may have therapeutic agents associated with the surface, to promote bone growth. Like other biomaterials tested in this research project, the bioceramic samples were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, time of flight secondary ion mass spectrometry and laser particle size analyzer. The surface characterization results at the nanometric level showed that the Ca / P and O / Ca ratios in the outer layers of all of the samples are different from those expected.

Finally, the nanosurface study of the three groups of biomaterials demonstrated the effectiveness of the quantitative methods of characterization as the X-ray photoelectron spectroscopy, when compared to qualitative methods, such as Fourier transform infrared. Further, after the correlation

between surface characterization and toxicological test results, and following a review of the available literature, we conclude that, to minimize the unsatisfactory results of in vitro and in vivo testing with biomaterials for drug delivery, it is very important to have a deep understanding of the physicochemistry of the first atomic layers of the surface.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVIII
INTRODUCTION.....	1
Publications et présentations faites par le candidat :.....	2
Publications qui font partie du corps de cette thèse :	2
Publications qui sont en annexe de cette thèse :.....	3
Présentations en conférence :	3
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1 La nanotechnologie pour la délivrance de médicaments	4
1.2 La surface au niveau nanométrique.....	5
Les interactions entre les nanoparticules et les protéines:.....	5
1.3 Les biomatériaux	7
1.3.1 Les nanoparticules de l'oxyde de fer.....	7
1.3.2 Le chitosane:	10

1.3.3 Les biocéramiques.....	11
1.4 Les techniques de caractérisation:.....	15
CHAPITRE 2 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL, OBJECTIFS ET SYNTHÈSES DES TRAVAUX RÉALISÉS	18
2.1 Démarche de l'ensemble du travail.....	18
2.1.1 Projet NO.....	18
2.1.2 Projet Biocéramiques	20
2.2 Objectifs de la thèse	20
2.2.1 Objectif principal.....	20
2.2.2 Objectifs spécifiques	20
2.3 Synthèses des articles	21
2.3.1 Article 1	21
2.3.2 Article 2.....	22
2.3.3 Article 3.....	22
CHAPITRE 3 ARTICLE 1: CORE-SHELL NANOPARTICLES AS PRODRUGS: POSSIBLE CYTOTOXICOLOGICAL AND BIOMEDICAL IMPACTS OF BATCH-TO- BATCH INCONSISTENCIES	24
3.1 Abstract	24
3.2 Highlights	25
3.3 Introduction	25
3.4 Experimental	26
3.5 Results	29
3.6 Discussion	35
3.7 Conclusions	40

3.8	Acknowledgment	40
3.9	References	40
CHAPITRE 4 ARTICLE 2: THE EFFECT OF ETHYLENE OXIDE STERILIZATION ON THE SURFACE CHEMISTRY AND <i>IN-VITRO</i> CYTOTOXICITY OF SEVERAL KINDS OF CHITOSAN		
		42
4.1	Abstract	42
4.2	Introduction	43
4.3	Experimental	45
4.4	Results	49
4.5	Discussion	60
4.6	Conclusions	63
4.7	Acknowledgments	63
4.8	References	64
CHAPITRE 5 ARTICLE 3: NANOSCALE SURFACE CHARACTERIZATION OF BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE, WITH COMPARISONS TO CALCIUM HYDROXYAPATITE AND B-TRICALCIUM PHOSPHATE BIOCERAMICS		
		67
5.1	Abstract	67
5.2	Introduction	68
5.3	Material and Methods:	71
5.4	Results:	73
5.4	Discussion	82
5.5	Conclusions:	84
5.6	Acknowledgments	84
5.7	References:	85

DISCUSSION GÉNÉRALE	91
CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Références de techniques de caractérisations utilisées en nanotechnologie	16
Table 3.1 C1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	30
Table 3.2 O1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	30
Table 3.3 Si2p peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	30
Table 3.4 C1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	32
Table 3.5 O1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	33
Table 3.6 N1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	33
Table 3.7 Si2p peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	34
Table 3.8 XPS peak positions of primar amines and their oxidation products	37
Table 3.9 XPS peak positions of secondary amines and their oxidation products.....	38
Table 4.1 Vibrational Bands of Chitosan	53
Table 4.2 Chitosan XPS peaks expected	56
Table 5.1 Particle sizes determined by laser granulometry (particle volume) and XRD (crystal size) techniques	76
Table 5.2 Ca/P and O/Ca atomic ratios of the three bioceramics	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.1 La méthode de silanisation utilisée	9
Figure 1.2 SEM d'une boule de chitosane avec les nanoparticules	10
Figure 2.1 Représentation schématique de l'incorporation de nanoparticules aux boules de chitosane.....	19
Figure 3.1 Photomicrographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; (a) bright field TEM: cores are visible, (b) SEM: surface structure is visible	27
Figure 3.2 Photomicrographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$; (a) bright field TEM: cores are visible, (b) SEM: surface structure is visible.....	28
Figure 3.3 Atomic percentages of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	31
Figure 3.4 FTIR spectra of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	32
Figure 3.5 Atomic percentages of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$	35
Figure 3.6 Hydrolysis of (a) TEOS and (b) silane	36
Figure 4.1 Chemical structure of chitin or chitosan.	43
Figure 4.2 XRD spectra of chitosan before sterilization.	50
Figure 4.3 SEMs of (A) Ch79, (B) Ch85, (C) Ch95 and (D) CEC	51
Figure 4.4 FTIR spectra of chitosan samples before and after (st) sterilization with ethylene oxide	52
Figure 4.5 XPS-determined relative surface compositions before and after sterilization with ethylene oxide.	54
Figure 4.6 XPS spectra before and after sterilization with ethylene oxide	55
Figure 5.1 Particle sizes measured by laser granulometer	73
Figure 5.2 SEM photomicrographs of the HA: (a) and (d), BCP: (60HA/40TCP) (b) and (e), and β -TCP: (c) and (f).....	74
Figure 5.3 X-ray diffraction (XRD) spectra of the three bioceramics	75

Figure 5.4 XPS high-resolution results for O1s, and P2p spectra of HA, β -TCP and BCP.....	77
Figure 5.5 Infrared spectra of HA and β -TCP and BCP	79
Figure 5.6 Positive TOF-SIMS spectra of (a) HA, (b) β -TCP and (c) BCP; negative TOF-SIMS spectra of (d) HA, (e) β -TCP and (f) BCP.	82

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AEAP3	N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane
AFM	Microscopie à force atomique
ANSI	American National Standard
AO	Acide oléique
ATCC	American Type Culture Collection
BCP	Phosphate de calcium biphasé
CDA	Apatite déficient de calcium
CEC	Carboxyéthyl chitosane
Ch	Chitosane
DA	Degrée d'acétylation
DD	Degrée de déacétylation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EtO	Oxyde éthylène
FBS	Sérum fœtal bovine
FDA	US Food and Drug Administration

FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HA	Calcium hydroxyapatite
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
LDH	Lactate déshydrogénase assay
MPa	Megapascal
MTT	Methyl thiazole tetrazolium assay
NIST	National Institute of Standards and Technology (EUA)
NO	Oxyde nitrique
NPs	Nanoparticules
PBS	Solution tampon phosphate salin
PubMed	US National Library of Medicine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire
St	Stérilisé
TEM	Microscopie électronique à transmission
TEOS	Orthosilicate de tétraéthyle
TOF-SIMS	Spectrométrie de masse à ionisation secondaire à temps de vols
VDW	Forces de van der Waals
XPS	Spectroscopie photoélectronique par rayons X

XRD	Diffraction des rayons X
β -TCP	Phosphate Tricalcique Beta

Élément chimique

Bi	Bismuth
C	Carbone
Cl	Chlore
F	Fluorine
Fe	Fer
H	Hydrogène
N	Azote
Na	Sodium
O	Oxygène
P	Phosphore
Si	Silicium

INTRODUCTION

La nanotechnologie a beaucoup évoluée dans la dernière décennie dans le domaine biomédical. Plusieurs techniques ont été proposées utilisant des nanoparticules pour interagir avec les tissus biologiques, soit au niveau de la membrane cellulaire, d'organelles cytoplasmiques, ou au niveau des protéines ou de l'ADN. Cependant, le développement des méthodes thérapeutiques utilisant des nanoparticules a été un peu retardé, à cause des résultats controversés au niveau de la biocompatibilité. En fait, l'interaction entre les nanoparticules et les biomolécules présentes dans les fluides biologiques a été mise à l'avant-scène comme un facteur fondamental pour obtenir une réponse favorable de l'organisme vivant.

À cet égard, la caractérisation des surfaces des biomatériaux a beaucoup attiré l'attention des chercheurs, car la plupart des réactions biologiques se produisent au niveau de la surface. Il paraît clair que la composition chimique des couches d'atomes les plus externes est responsable d'établir une interaction dynamique avec les composants du milieu biologique. La composition chimique au niveau nanométrique pourrait aussi contrôler la cinétique et la thermodynamique de cette interaction.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'effet de la surface des nanoparticules et de microparticules qui ont été utilisées dans les deux projets suivants :

1. Pour la délivrance de médicaments, en utilisant des nanoparticules magnétiques capables de transporter l'oxyde nitrique (NO) jusqu'à la paroi des poumons. Dans ce projet, la surface de nanoparticules superparamagnétiques (magnétite - Fe_3O_4) a été fonctionnalisée avec la molécule d'oxyde d'azote (NO) et ensuite elles ont été insérées dans des microsphères polymériques de chitosane.
2. Pour le remodelage de l'os en utilisant des biocéramiques comme l'Hydroxyapatite, le Phosphate Tricalcique Beta et le Phosphate de Calcium Biphase

Cette thèse est divisée en cinq chapitres. Une synthèse bibliographique de l'état de l'art par rapport aux matériaux utilisés dans ces projets a été préparée dans le chapitre 1. Dans le chapitre 2, les objectifs de cette thèse et un résumé des projets dont elle fait partie sont présentés. Une synthèse de chaque article est aussi présente dans ce chapitre.

Le corps de cette thèse est composé par 3 articles scientifiques, déjà publié, correspondant aux chapitres 3, 4 et 5. Les deux premiers articles font partie du projet de la délivrance de NO, utilisant nanoparticules de Fe_3O_4 , et le dernier article fait partie du projet de l'étude de la surface des biocéramiques pour la croissance osseuse.

Les titres de ces chapitres sont :

Chapitre 3 : Nanoparticules enrobes pour la délivrance de médicaments. L'importance biomédicale et cytotoxicologique des incohérences de lot à lot

Chapitre 4 : L'effet de stérilisation à l'oxyde de l'éthylène sur la chimie de surface et la biocompatibilité *in vitro* des plusieurs types de chitosanes.

Chapitre 5 : Caractérisation de surface à l'échelle nanométrique de biocéramiques de phosphate de calcium biphasique, avec des comparaisons au calcium hydroxyapatite et phosphate tricalcique bêta.

Pour terminer, une discussion générale et les conclusions sur l'ensemble des résultats obtenus avec recommandation pour des travaux futures sont présentées à la fin de la thèse

Publications et présentations faites par le candidat :

Publications qui font partie du corps de cette thèse :

- I. França R , Zhang XF , Veres T , Yahia L , Sacher E, "Core-shell nanoparticles as prodrugs: possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to- batch inconsistencies.", Journal of Colloid and Interface Science, 389(1): 292-297, 2013
PubMed ID: 23041026
- II. França R , Mbeh DA , Djavanbakht Samani T, Le Tien C , Mateescu MA , Yahia L , Sacher E, "The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan.", Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials 101B: 1444-1455. PubMed ID: 23744606
- I. Rodrigo França; Taraneh Djavanbakht Samani; Ghislaine Bayade; L'Hocine Yahia; Edward Sacher, "Nanoscale surface characterization of biphasic calcium

phosphate, with comparisons to calcium hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bioceramics.", *Journal of Colloids and Interface Science*, 420, 182-188, 2014.

Publications qui sont en annexe de cette thèse :

- Poulin, Suzie; França, Rodrigo.; Moreau-Bélanger, Laurence; Sacher, Edward, "Confirmation of X-ray Photoelectron Spectroscopy Peak Attributions of Nanoparticulate Iron Oxides, Using Symmetric Peak Component Line Shapes", *Journal of Physical Chemistry C*, 114(24), 10711-10718, 2010
- Mbeh DA , França R , Merhi Y , Zhang XF , Veres T , Sacher E , Yahia L, "In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: biological and cytotoxicological effects.", *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 100(6) : 1637-1646, 2012. PubMed ID: 22447386

Présentations en conférence :

- Nanoscale surface characterization of bioceramics for bone reconstruction. Rodrigo França; Taraneh Djavanbakht Samani; Ghislaine Bayade; L'Hocine Yahia; Edward Sacher. ITI International Meeting, April 2014, Genève, Suisse
- In Vitro Biocompatibility Testing and Surface Analysis of Chitosans: Effect of Ethylene Oxide Sterilization. França, Rodrigo Mbeh, Doris; Canh, Le Tien; Mateescu, Mircea; Yahia, L'Hocine Sacher, Edward. Meeting of Regroupement Québécois sur les Matériaux de Pointe, Mai, 2010, Montréal.

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, la revue de la littérature sera divisée en quatre parties:

1. La nanotechnologie pour délivrance de médicaments
2. La surface des nanomatériaux
3. Les biomatériaux utilisés
4. Les techniques d'analyses de surface

1.1 La nanotechnologie pour la délivrance de médicaments

L'utilisation de la nanotechnologie en science de la santé est déjà bien établie dans la recherche pharmaceutique. À cet égard, plusieurs auteurs (Sahoo et al, 2003; Laurent et al, 2014) ont analysé les différentes nanotechnologies d'administration des médicaments et leur impact économique sur les industries pharmaceutiques et biomédicales. Par exemple la demande d'un système ciblé de distribution de médicament seulement aux États-Unis s'augmente de près de 9% par an à plus de US \$ 82 milliards (année 2007). Ils ont conclu que les méthodes de diagnostic précoce des pathologies et la délivrance ciblée de médicaments sont les domaines prioritaires de recherche, où les nanotechnologies joueront un rôle essentiel.

En 2005, Gupta et al. ont conclu que toutes ces applications biomédicales et de bio-ingénierie exigent que ces nanoparticules (NPs) aient des valeurs élevées de magnétisation et de taille inférieure à 100 nm, avec une étroite distribution granulométrique des particules, de sorte que les particules aient des propriétés physiques et chimiques uniformes. En outre, ces applications ont besoin de revêtement de surface des nanoparticules superparamagnétiques (magnétite, maghémite ou d'autres ferrites insolubles), qui doivent être non seulement non toxiques et biocompatibles, mais aussi peuvent permettre une livraison ciblée avec localisation des particules dans un domaine spécifique. À cette fin, la plupart des travaux dans ce domaine ont été réalisés dans l'amélioration de la biocompatibilité des matériaux, mais peu de recherches et développements ont été réalisés dans l'amélioration de la qualité des particules magnétiques, la distribution de leur taille, leur forme et leur caractéristiques de surface, en plus de leurs caractérisations pour obtenir un protocole de contrôle de la qualité de ces particules. La nature des revêtements de surface et leurs

dispositions sur les nanoparticules déterminent non seulement la taille globale du colloïde mais également joue un rôle important dans la biocinétique et la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme.

Il faut remarquer que la taille des nanoparticules d'oxyde de fer est importante, car cela peut fortement affecter le temps de résidence des nanoparticules dans l'organisme. Par exemple, Oberdörster et al. (2005) ont signalé que les nanoparticules de taille comprise entre 10 et 100 nm auront un temps de résidence optimal dans la circulation sanguine alors que les particules de 200 nm ou inférieures à 10 nm seront retenues par la rate ou le système rénal, respectivement.

Les types de couches pour les NPs d'oxydes de fer dépendent de la fin de l'application et doivent être choisis selon les besoins, que ce soit visant la réponse de l'inflammation ou d'agents anticancéreux. Les nanoparticules magnétiques peuvent se lier à la drogue, aux protéines, aux enzymes, aux anticorps, ou aux nucléotides et peuvent être adressées à un organe, de tissus ou de tumeurs en utilisant un champ magnétique.

Shin et al.,(2007), ont divulgué la technique de fonctionnalisation de nanoparticules de silice avec du NO. L'amine de groupes fonctionnels sur les nanoparticules de silice ont été converties en N-NO diazéniumdiolate donateurs via l'exposition à de fortes pressions du NO (5 atm) sous conditions alcalines. Les nanoparticules de silice ont été caractérisées par l'état solide la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie à force atomique (AFM), l'adsorption-désorption du gaz. Les auteurs ont souligné les avantages des molécules donateurs NO: (1) le stockage de grandes quantités de NO, (2) la capacité de moduler la cinétique de libération de NO, et (3) la facilité de régler la taille des particules en fonction de la composition de la particule.

1.2 La surface au niveau nanométrique

Les interactions entre les nanoparticules et les protéines:

En dépit de la remarquable rapidité de développement des nanosciences, on sait relativement peu de l'interaction de l'échelle nanométrique des objets avec les systèmes vivants. Selon Cedervall et al. (2007), en raison de leur petite taille, les nanoparticules ont des propriétés distinctes par rapport à la forme macro des mêmes matériaux. Ces propriétés sont rapidement en train de révolutionner de nombreux domaines de la médecine et technologie. Ces auteurs suggèrent que

dans un liquide biologique, les protéines s'associent à des nanoparticules, et la quantité et la forme de ces protéines à la surface des nanoparticules conduiront à la réponse *in vivo*. Alors, il y a une compétition des protéines pour la surface de la nanoparticule où la protéine gagnante, appelé protéine "couronne", définira, en grande partie, l'identité biologique de la particule.

Lynch et al (2008) ont proposé que plutôt que la nanoparticule simple elle-même, c'est la «corona» des biomolécules associées à la surface qui définit l'identité biologique des nanoparticules. C'est donc cette couronne qui pourrait conduire à un système plus approprié du classement de nanosécuritaire, et c'est aussi cette couronne qui pourrait être utilisée pour fabriquer les nanomédicaments.

Lundqvist et al 2004, ont analysé l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules de silice des diamètres de 6,9 et 15 nm. Le résultat de cette étude montre que les différences de courbure des particules peuvent fortement influencer le montant de la structure secondaire de la protéine qui est déposée. Les particules d'un diamètre plus élevé permettent la formation d'interactions plus fortes entre les particules et protéines et aussi entraîneront des perturbations plus importantes à la structure secondaire des protéines attachées. En revanche, les effets sur la structure tertiaire semblent être indépendants de la courbure des particules.

Selon Nel et al (2014), l'interface nano-bio comprend trois composants que interagissent de façon dynamique: (i) la surface de la nanoparticule, dont les caractéristiques sont déterminées par la composition physico-chimique; (ii) l'interface solide-liquide et les changements qui se produisent lorsque la particule interagit avec les composants dans le milieu environnant; (iii) une zone de contact de l'interface solide-liquide et des substrats biologiques. Dans un milieu donné, les caractéristiques des nanoparticules les plus importants qui déterminent les propriétés de surface sont la composition chimique, la fonctionnalisation de surface, la forme et le rayon de courbure, la porosité et la cristallinité de la surface, l'hétérogénéité, la rugosité, et l'hydrophobicité ou hydrophilicité (Nel et al., 2006; Oberdorster et al., 2005, Vertegel et al., 2004). Autres propriétés, tel que la charge de surface (potentiel zêta), l'agrégation des particules, état de dispersion, la stabilité / biodégradabilité, les caractéristiques de dissolution, d'hydratation et de valence de la surface, sont déterminées par les caractéristiques de la suspension, y compris la force ionique, le pH, la température et la présence de grandes molécules organiques (par exemple, des protéines) (Sigmund, 2005). Les caractéristiques des particules contribuent activement aux interactions

avec le milieu selon: (i) l'adsorption des ions, des protéines, des matières et des détergents organiques naturelles; (ii) la formation d'une double couche; (iii) la dissolution; ou (iv) la diminution de l'énergie libre de surface par la restructuration de la surface (Nel et al., 2014).

Beaucoup de ces propriétés des nanoparticules déterminent les forces qui opèrent à l'interface – particules/médium avec une caractéristique de longueur décroissante (Min et al., 2008). Ces forces comprennent les forces de longue portée comme le van der Waals (VDW) et généralement les forces électrostatiques de répulsion, plus les forces de courte portée découlant de la charge-. Interactions avec les médias (par exemple les interactions entre protéines) pourrait également induire des changements à grande échelle, tels que les nanoparticules dissolution, le lessivage d'ions, la transformation de phase et de l'agglomération (Velegol, 2007; Nel et al., 2014).

1.3 Les biomatériaux

1.3.1 Les nanoparticules de l'oxyde de fer

Les nanoparticules utilisées dans cette étude se composent d'oxydes de fer (Fe_3O_4) qui peuvent être ciblées sur la zone requise par aimants externes. Ils présentent des propriétés intéressantes telles qu'un superparamagnétisme, une irréversibilité à haut champs, un champ de saturation élevée, une anisotropie (Kodama, 1999). Grâce à ces propriétés, les particules ne présentent plus l'interaction magnétique après que le champ magnétique externe soit retiré.

Selon Mahmoudi et al., (2011), le but ultime de l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique en biomédecine est de réduire la souffrance des patients en appliquant des traitements sélectifs où l'efficacité est par l'amélioration de site des concentrations, tandis que les effets secondaires généraux sont évités; en outre, par exemple la métastase des cellules cancéreuses est limitée. Bien que, pour la plupart, les NPs sont actuellement étudiées à une échelle expérimentale (sauf pour les produits approuvés par la FDA), il y a un certain nombre de technologies de pointe développées pour la synthèse, et la fonctionnalisation de revêtement NPs multifonctionnels. Des études qui ont démontré la présence de NPs dans les mitochondries conduisent à un grand espoir chez les chercheurs pour ouvrir la possibilité de traiter dans un proche avenir les maladies mitochondriales et les dysfonctionnements cardiaques en utilisant des particules chargées de médicament. Ces auteurs ont aussi affirmé que, compte tenu de leur rôle

mitochondrial, il est possible qu'un jour, des "NPs intelligents" pourraient être conçus pour contrôler le processus de vieillissement.

De nombreux procédés chimiques peuvent être utilisés pour synthétiser des nanoparticules magnétiques pour des applications biomédicales (Laurent et al, 2008):

- des microémulsions (Chin et Yaacob, 2007)
- des synthèses sol-gel, (Albornoz et Jacobo, 2006)
- les réactions sonochimiques (Kim et al., 2005)
- les réactions hygrothermiques (Wan et al., 2005)
- l'hydrolyse et la thermolyse de précurseurs (Kimata et al., 2003)
- l'écoulement synthèse par injection (Alvarez et al., 2006)
- la synthèse à électrospray (Basak et al., 2006)

Selon Laurent et al. (2008), la synthèse de nanoparticules superparamagnétiques est un processus complexe en raison de leur nature colloïdale. Le premier défi chimique principal consiste à définir des conditions expérimentales, conduisant à la population de grains magnétiques monodisperses de taille appropriée. Le deuxième point important est de choisir un processus reproductible qui peut être industrialisé sans aucune procédure de purification complexe, comme : l'ultracentrifugation (Sjorgren et al., 1997), chromatographie d'exclusion stérique (Nunes et Yu, 1987), filtration magnétique ou le débit d'un champ gradient (Thurm et Odenback, 2002). Selon Laurent et al. (2008), ces méthodes sont utilisées pour préparer des particules avec une composition homogène et une distribution de taille étroite. Toutefois, la méthode la plus courante pour la production de nanoparticules de magnétite est la technique de co-précipitation chimique de sels de fer (Morisson et al., 2005; Sun et al., 2004; Oju et al., 2005; Lee et al., 2004).

Plusieurs études ont proposé la silice en tant que matériau de revêtement pour nanoparticules magnétiques (Alcala et Real, 2006; Gushikem et Rosatto, 2001; Ma et al., 2006) Habituellement, une couche de silice inerte sur la surface de nanoparticules de magnétite prévient leur aggrégation dans un liquide, d'améliorer leur stabilité chimique, et offre une meilleure protection contre la toxicité (Lesnikovich et al., 1990). Ce revêtement de silice peut stabiliser les nanoparticules de

magnétite car elles sont chargées négativement. Par conséquent, le revêtement de silice améliore la répulsion coulombienne des nanoparticules magnétiques. (Laurent et al., 2008).

Différentes approches ont été explorées pour générer des nanosphères de silice magnétiques. Le premier procédé repose sur le bien connu processus Stöber, dans lequel la silice a été formée *in situ* par hydrolyse et condensation d'un précurseur sol-gel, tel que l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) (Stöber et al., 1968; Lu et al., 2002; Deng et al., 2005; Im et al., 2005). Par exemple, Im et al (2005) ont préparé des colloïdes de silice chargée avec des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique à l'aide de ce procédé. Cette étude a montré que la taille finale des colloïdes de silice dépend de la concentration des nanoparticules d'oxyde de fer et du type de solvant, car la taille de la silice est étroitement liée à la quantité de graines (gouttes de l'émulsion). De grands colloïdes ont été obtenus à des concentrations inférieures de nanoparticules d'oxyde de fer et en alcool avec des poids moléculaires plus élevés. (Laurent et al., 2008).

L'un des avantages d'avoir une surface enrichie en silice est la présence de groupes silanol de surface qui peut facilement réagir avec divers agents de couplage pour fixer de manière covalente des ligands spécifiques à ces particules magnétiques, par exemple, des groupes amine ont été introduits sur la surface de la silice des nanoparticules enrobées de magnétite par hydrolyse et condensation d'un organosilane, tels que N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane (AEAP3), sur la surface de la magnétite nanoparticules. (Mornet et al., 2005; Laurent et al., 2008; Del-Campo et al., 2005; Yamaura et al. 2004) Ceci était la méthode de silanisation utilisée dans cette thèse (Figure 1.1).

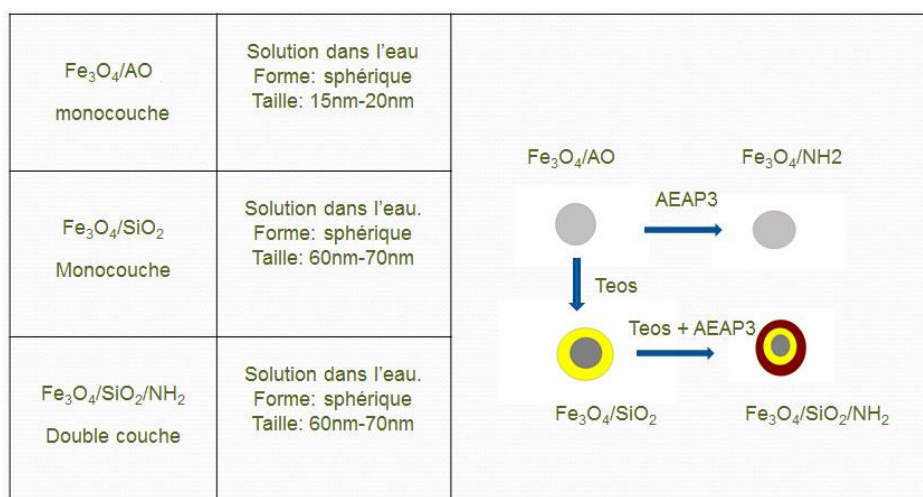


Figure 1.1.1 La méthode de silanisation utilisée

1.3.2 Le chitosane:

Le chitosane est un polymère biocompatible, biodégradable, non toxique, et autoadhésif, ce qui le rend attrayant pour les applications en médecine et en pharmacie. Très prometteur pour ces applications sont les nanoparticules de chitosane superparamagnétique des oxyde de fer sur la base d'un noyau composé d'oxydes de fer qui peuvent être ciblés par des aimants externes.

Peniche et al (2005) ont préparé microsphères de chitosane super-paramagnétiques. À cette fin, des particules de magnétite ont été dispersés dans le chitosane dans une solution d'acide acétique. Les microsphères de chitosane magnétiques obtenus ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage, l'analyse de la différence thermique, et la magnétométrie vibrationnelle. Les microsphères ont une large distribution de taille, allant de 43 ± 25 à $255 \pm 55 \mu\text{m}$, qui dépend des conditions de la réaction.

Belessi et al (2008) ont synthétisé et caractérisé, par diffraction des rayons X (XRD), microscopie électronique à transmission (TEM), les nanoparticules de magnétites enrobées de chitosane. La conclusion des auteurs est que cet ensemble possède: a) une stabilité physico-chimique suffisante; b) une très haute saturation de magnétisation qui est accessible à faible champs appliquée; c) le comportement superparamagnétique à la température ambiante; d) un faible contenu en matrice organique; e) la forme cubique bien définie de particules avec une taille (10-40 nm) pour des applications biomédicales.

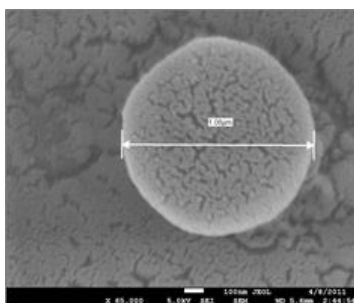


Figure 1.2 SEM d'une boule de chitosane avec les nanoparticules

1.3.3 Les biocéramiques

Dans le deuxième projet, dont fait partie cette thèse, nous avons étudiés les biocéramiques pour la croissance osseuse. Nous avons caractérisé la nano surface de trois types de biocéramique : l'Hydroxyapatite, le Phosphate Tricalcique Beta et le Phosphate de Calcium Biphase

1.3.3.1 Hydroxyapatite

La définition d'« apatite » peut être utilisée pour décrire toute une gamme de céramiques avec une structure similaire, mais avec une composition différente. L'hydroxyapatite (HA) possède un rapport Ca/P de 1.67, une formulation chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et un cristal à la forme hexagonale (LeGeros & LeGeros, 2008). La substitution dans la structure cristalline de HA (comme, par exemple : Ca par Sr or Mg, OH par F, Cl ou CO_3), la morphologie et la taille du cristal peuvent modifier la stabilité chimique comme la solubilité (Young et Elliott, 1966) (LeGeros, 1984).

Les apatites biologiques sont présents dans la partie inorganique de tous les tissus calcifiés comme l'os et les dents. Pendant plusieurs années, HA a été réputé comme le seul type d'apatite biologique. Cependant, LeGeros (1967, 1981) a démontré la grande présence de CO_3 qui remplace le groupement PO_4 et cause la formation de carbonate apatite dans les apatites biologiques.

La fabrication de HA synthétique peut être obtenue par les processus suivants :

- Les réactions dans l'état solide
- La réaction hydrothermale
- Compactage et frittage de la poudre par précipitation

Pour les réactions à l'état solide, les composés de calcium sont mélangés, comprimés et frittés à une température minimale de 950°C . Dans la méthode utilisant les réactions hydrothermales, la température est de 275°C , car le matériau est aussi sous une pression de vapeur de 82.74 MPa (Nakamura et al, 1996). Dans la technique par précipitation, il y a une réaction entre le nitrate de calcium et une solution de phosphate d'ammonium (Aoki, 1994).

Les biocéramiques comme HA ont la propriété d'osteoconductivité, cela veut dire, la capacité d'être un échafaudage pour guider la nouvelle formation d'os. L'osteoconductivité permet à l'os

de proliférer sur le matériau, résultant en la formation d'une nouvelle matrice osseuse. Cependant, HA ne possède pas la propriété d'être osseointducteur, qui permettrait la formation d'os par différenciation de cellules indifférenciées (LeGeros & LeGeros, 2008).

1.3.3.2 Phosphate Tricalcique Beta (*β -Tricalcium Phosphate*)

Le phosphate tricalcique est le composé de phosphate de calcium le plus utilisé en matériaux implantés. Il est utilisé comme un remplacement osseux, comme partie de ciment de fixation de prothèses et aussi revêtement de prothèses métalliques. Le nom phosphate tricalcique est utilisé par différents types de composés qui possèdent l'ion orthophosphate PO_4^{3-} avec le rapport Ca/P de 1,5; dont la formule chimique est $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Rey et al. 2008).

Les phosphates tricalciques sont bio-résorbables et plus solubles que l'hydroxyapatite (LeGeros et al. 1995). Le plus utilisé parmi la famille de phosphate tricalcique est la phase cristalline phosphate tricalcique bêta (β -TCP). Le β -TCP est une phase stable de phosphate tricalcique anhydre du système rhomboédrique avec 21 unités de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ par cellule hexagonale (Dickens et al 1974). Le β -TCP possède une structure intéressante avec la présence des ions (anions et cations) qui peuvent être placés parallèlement à l'axe c. Il est important de noter qu'environ 15% de Ca^{2+} peut être substitué par Mg^{2+} sans avoir une altération du grade cristallin (Rowles, 1968; Clement et al., 1989).

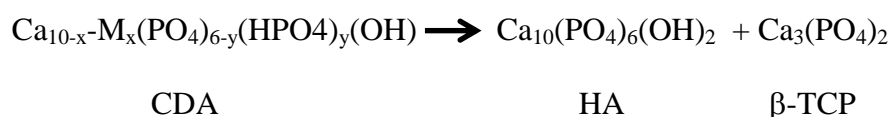
Selon Ito et al. (2002, 2005), la solubilité du β -TCP dépend du degré de substitutions de Mg ou Zn, car le taux de dilution est très sensible à la présence de ces ions. Par exemple, la concentration de $2 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ a démontré l'inhibition complète de la dissolution.

La principale difficulté pour fritter β -TCP est la température de transition à α -TCP. Cette température de transition est environ de 1125°C , mais peut être élevée par la présence d'impuretés comme Mg, Fe, Mn et Zn. Le fabricant cherche à synthétiser le β -TCP entre une température de 1100°C jusqu'à 1250°C car au-delà de cette température les grains seront convertis en α -TCP. La présence de grains α -TCP va engendrer la perte de densité et une réduction de propriétés mécaniques de la biocéramique. (Rey et al. 2008).

1.3.3.3 Phosphate de Calcium Biphase (Biphasic Calcium Phosphate)

Le phosphate de calcium biphase (BCP) consiste en un assemblage entre HA et β -TCP, qui a été premièrement décrite par Ellinger et al. (1986). Les premières versions ont possédé un pourcentage de 80% de HA et 20% de β -TCP, jusqu'à ce que plusieurs études aient démontré que la bioactivité augmente quand le rapport HA/ β -TCP était de 60/40 (LeGeros et al. 1988, 1990; Daculsi et al 1989). Le développement de BCP a créé la possibilité d'un meilleur contrôle des mécanismes de résorption et de la formation d'os, car l'implantation du BCP produit une forte liaison avec l'os et forme une interface supérieure quand comparée aux biocéramique inertes. (Daculsi et al. 2008).

Le BCP est obtenu quand l'apatite déficiente de calcium (CDA) est frittée au-delà de 900°C, selon l'équation suivante : (LeGeros, 1991).



L'apatite est considérée CDA quand le rapport est inférieur à 1.67, dans la formule au-dessus M représente un autre ion comme Na^+ or Mg^{2+} qui peut remplacer Ca^{2+} . D'autres techniques moins utilisées peuvent être employées comme : l'hydrolyse de phosphate de calcium non-apatite or pour le mélange mécanique de deux types de biocéramique (HA + β -TCP). Cette dernière technique n'est pas recommandée quand se désire obtenir le BCP avec un ratio constant et une distribution homogène des grains cristallins. (Daculsi et al. 2008).

Les macroporosités et les microporosités jouent un très grand rôle dans la performance biologique du BCP. La macroporosité est le résultat de l'évaporation de matériaux volatil durant la synthèse et la microporosité est la conséquence de la température durant la sintérisation (LeGeros et al., 2003). La taille idéale de la porosité doit être la même que dans l'os. Trecant et al. (1994) ont démontré que la microporosité avec un diamètre $\leq 10\mu\text{m}$ permet la circulation de fluide tandis que la macroporosité avec un diamètre $> 100\mu\text{m}$ fournit un échafaudage pour la colonisation de l'os.

Les biocéramiques comme le phosphate de calcium ou les vitres bioactives n'ont pas la capacité d'être osseointensif, cependant plusieurs articles dans la littérature démontrent que le BCP peut être osseointensif (Ripamonti, 1991; Kubiki et al, 1998; Le Nihouannen et al, 2005). Reddi

(2000) a expliqué que l'osseoinduction peut être provoquée par la circulation de fluide biologique riche en facteur de croissance qui peut circuler dans la microporosité. D'autres chercheurs ont proposé que la nanostructure de surface, l'énergie de surface et la rugosité, peuvent causer la division asymétrique des cellules indifférenciées en ostéoblastes. (Diaz-Flores et al., 1992; Habiovic P et al., 2005; Daculsi et al., 2008).

L'effet ostéogénique/osseoconductif de BCP peut être aussi expliqué par la formation de microcristaux qui possèdent un ratio Ca/P similaire avec l'apatite d'os. La formation de ces cristaux est directement proportionnelle au rapport β -TCP/HA à BCP, alors un grand rapport va provoquer une grande formation de microcristaux. Les microcristaux seront incorporés par la matrice de collagène afin de produire le nouvel os. (LeGeros et al., 1988; LeGeros et Daculzi, 1990).

1.3.3.4 L'interaction Protéines –Biocéramiques

La nature sélective de l'adsorption des protéines et des biomolécules est influencée par les caractéristiques physico-chimiques de la surface des biomatériaux composée de phosphate de calcium. En effet, l'adsorption de protéines à la surface de biocéramiques est le premier événement, et un des plus essentiels, dans la cascade de réactions biologiques qui ont lieu lors de l'introduction de biocéramiques dans l'environnement biologique (Monteiro et al., 2003; Victor et Sharma, 2012).

La séquence des acides aminés présents dans la structure des protéines influence leurs activités et affecte l'interaction avec la surface de biocéramiques. Les trois principales protéines présentes dans le plasma : albumine, immunoglobuline et fibrinogène sont les composants importants de la couche de protéines adsorbées (Uniyal et Brash, 1982). Par exemple : Whicher et Brash (1978) ont démontré qu'une fine couche d'albumine peut diminuer l'adhésion et l'agrégation de plaquettes dans *in vivo* tests. La taille est aussi importante, car les grandes protéines auront plus de places pour se lier, ce que pourraient leur donner plus de potentiel d'être adhérent à la surface. Pourtant, l'adsorption de protéines est gouverné par l'effet Vroman, qui dit que les protéines plus concentrées et de petites tailles, qui ont une grande diffusion, auront la tendance à être adsorbées

en premier; et dans un deuxième temps, les protéines plus stables déplaceront celles qui sont arrivées en premier (Vroman et al., 1980; Jung et al 2003).

L'interaction électrostatique protéine –biocéramique peut être influencée par l'énergie de surface et les charges des protéines dans les différentes solutions. Dans une solution tampon phosphate salin (PBS) HA, BCP et β -TCP ont une charge surfacique négative et ont la préférence pour adsorber davantage les protéines basiques comme lysozyme plutôt que les protéines acides comme albumine (Boonthekul et al., 2003; Ohta et al., 2001; Victor et Sharma, 2012).

1.4 Les techniques de caractérisation:

La caractérisation de l'interface solide-liquide est un défi majeur dans la compréhension de l'interface nanoparticules et l'environnement biologique. Contrairement à ce qu'on suppose souvent, le comportement trouvé à la surface de suspensions (par exemple : charge nette, le point isoélectrique ou la taille moyenne des agrégats) ne correspond pas à ceux qui se trouvent lors de l'évaluation de l'interface nanoparticules-biomolécules (Baca et al., 2006; Nel et al., 2014). L'interface solide-liquide déjà métastable est soumise à un environnement hétérogène et dynamique ou transitoire qui contribue à la formation de l'interface nano-bio. En outre, la difficulté de faire la caractérisation physico-chimique est que l'interface n'est pas à l'état d'équilibre. (Nel et al., 2014).

Les propriétés de nanoparticules dépendent de leur structure physique: la taille et la forme des particules, leurs microstructures et les phases chimiques dans lesquelles ils sont présentes. En outre, le comportement biologique des nanoparticules magnétiques dépend également fortement de leur taille et de la forme, ainsi que leur polydispersité, la charge et la nature du revêtement. Plusieurs techniques physico-chimiques sont utilisées pour déterminer ces paramètres. Les techniques physico-chimiques, telles que la microscopie atomique et chimique active (AFM), spectroscopie de photoélectrons par rayons-X, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), les spectres de masse d'ions secondaires (SIMS et TOF-SIMS), ont été utilisées pour étudier les propriétés de surface des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées. Le tableau 1.1 montre de façon schématique les techniques de caractérisation qui nous avons utilisées et quelques importants articles où elles sont présentées dans la littérature.

Tableau 1.1

Tableau 1.1 Références de techniques de caractérisations utilisées en nanotechnologie

Caractérisation	Radiation	Techniques	Auteurs
Chimique	Photon	FTIR	Lynch et al (2008) Lundqvist et al 2004
		XRD	Hong et al, (2009) Lynch et al (2008) Belessi et al (2008) Xu et al (2005)
		XPS	Gao et al (2009) Reddy et al (2009).
	Ions	TOF-SIMS	Lynch et al (2008) Lundqvist et al (2004) Burlingame et al. (1996)
Morphologique	électrons	SEM	Hong et al, (2009) Peniche et al (2005)
		TEM	Hong et al, (2009) Belessi et al (2008)

Il faut remarquer qu'à cause de l'épaisseur des couches de revêtement, il y a la nécessité d'utiliser plusieurs techniques de caractérisation pour obtenir de résultats concluants. Dans un article de Hong et al., (2009), les nanoparticules magnétiques obtenues ont été caractérisées par diffraction avec rayons-X, microscopie électronique en transmission et la microscopie électronique à

balayage. Comme conclusion, ils ont démontré que le poids moléculaire de la couche fonctionnalisée joue un rôle important pour déterminer la composition, la taille, la morphologie, l'efficacité et la propriété magnétique de NPs.

La tendance d'agrégation des NPs peut influencer la détermination de leurs dimensions par les techniques de caractérisation. Selon Xu et al, en 2005, différentes tailles de mêmes nanoparticules superparamagnétiques peuvent être obtenues selon la technique utilisée. Comme ils ont trouvé, une moyenne de taille de magnétite de 7,1 nm par diffraction des rayons X et celle de 8 nm par la microscopie électronique à transmission pour les échantillons préparés à 90 C. Une moyenne de diamètre hydrodynamique de 25 nm a été observé par la microscopie électronique à balayage et de celle de 25-300 nm a été obtenu par la spectroscopie de corrélation de photons. Par ailleurs, Talelli et al. (2009), qui ont étudié la capacité des micelles polymériques thermosensibles biodégradables (PEG) d'encapsuler nanoparticules de magnétite (5-10 nm de diamètre) enduit en acide oléique hydrophobe. Le microscope électronique à transmission a montré structures micellaires sphériques et mono-dispersés dans cette dispersion, d'une taille de 60 nm. Les photos prises en plus fort grossissement ont montré clairement les NPs de 5-10 nm piégées dans les particules de ~ 200 nm.

CHAPITRE 2 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL, OBJECTIFS ET SYNTHÈSES DES TRAVAUX RÉALISÉS

2.1 Démarche de l'ensemble du travail

2.1.1 Projet NO

La majeure partie de cette thèse a été réalisée dans un projet dont l'objectif principal était le développement de nanoparticules magnétiques capables de mener des substances thérapeutiques, tels que l'oxyde nitrique (NO) jusqu'à la paroi des poumons. La stratégie était de fonctionnaliser les surfaces de nanoparticules superparamagnétiques (magnétite - Fe_3O_4) avec la molécule NO et puis les insérer dans des microsphères polymériques de chitosane. Sous la forme d'un aérosol de taille sub-microscopique, cet ensemble serait déposé à la paroi alvéolaire, et grâce au pH local, la biodégradation de chitosane fournirait les NPs qui dispenseraient le gaz NO dans les quantités nécessaires et en doses sécuritaires.

En effet, en raison de la difficulté de transport jusqu'au niveau alvéolaire, les possibles avantages pharmacologiques du gaz NO restent encore inexplorés. Toutefois, plusieurs études (Traylor & Sharma 1992, Feldman et al.1993) ont montré un grand potentiel de la biochimie de l'oxyde nitrique, notamment: i) L'implication du NO dans plusieurs processus biologiques, y compris la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, ii) l'activation de l'enzyme guanylate cyclase, qui catalyse la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP), iii) l'effet cytotoxique de NO, après avoir été éliminé par macrophages ou d'autres cellules du système de défense, iv) la production endogène de NO de la conversion de l'acide aminé L-arginine par un mécanisme enzymatique, ce qui implique une famille d'enzymes appelés la synthase d'oxyde d'azote.

En règle générale, l'oxyde nitrique est la seule molécule endogène qui s'associe aux propriétés de neurotransmetteur, augmente la capacité d'agir en tant que régulateur de la pression sanguine et du système immunitaire

L'utilisation de Fe_3O_4 comme NP a été intense ces dernières années en raison de ses bonnes propriétés de biocompatibilité, même à des concentrations élevées dans les organes ciblés (Mbeh, A et al., 2012). À cela s'ajoute la possibilité de guider ces particules d'oxydes de fer dans le corps

en utilisant un champ magnétique externe. Pourtant, l'utilisation directe de nanoparticules magnétiques via le flux sanguin est strictement interdite, en raison de possibilité de l'agglomération de particules provoquer des embolies (Belessi et al, 2008). Alors, pour ce motif un de nos objectifs a été d'encapsuler les nanoparticules dans de boules de chitosane sous-microscopique, un polymère biocompatible, biodégradable, et non toxique, selon la Figure 2.1.

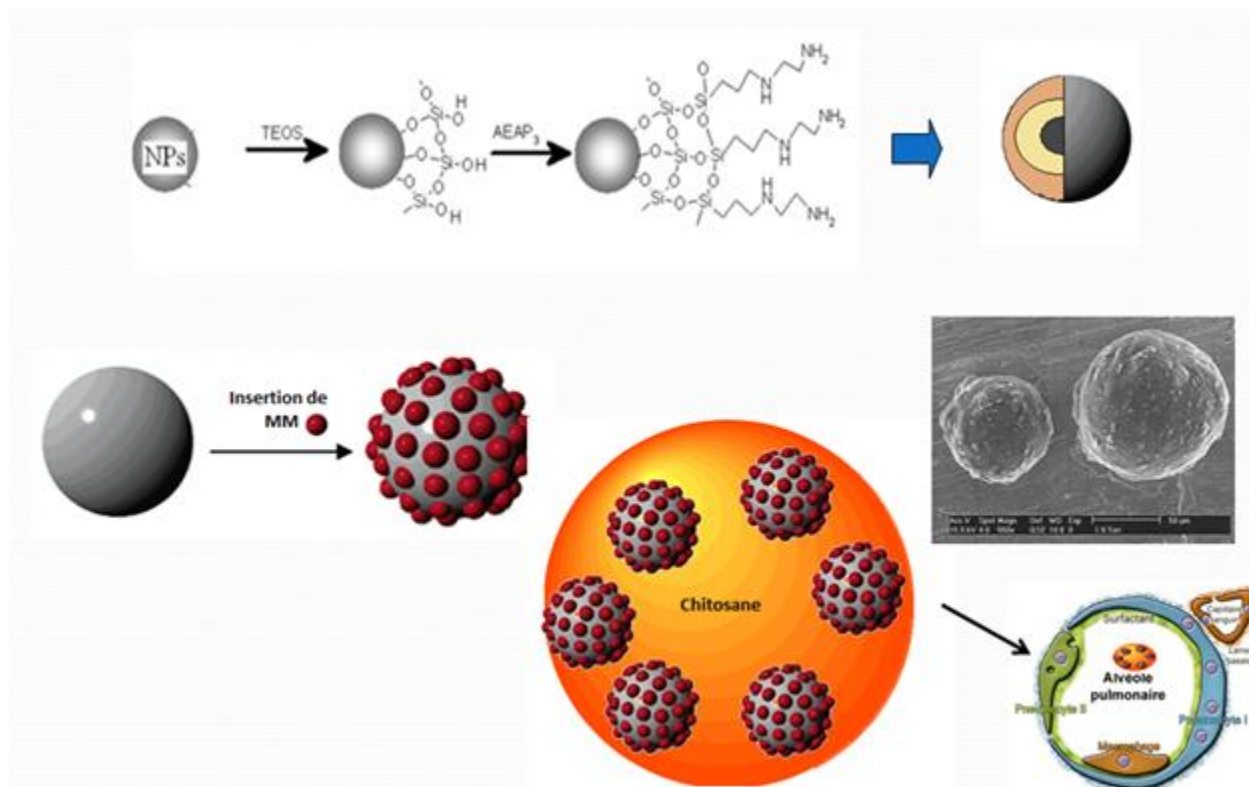


Figure 2.1 Représentation schématique de l'incorporation de nanoparticules aux boules de chitosane

La pertinence de ce travail est basée sur le potentiel de livraison de médicaments en utilisant de nanoparticules magnétiques qui peuvent fournir des avantages significatifs, tel que: i) la capacité de cibler des endroits précis dans le corps, ii) la réduction de la quantité de médicaments nécessaires pour atteindre une concentration particulière dans les environs de la cible, iii) la

réduction de la concentration de la drogue à des sites non ciblés en minimisant les effets secondaires graves.

2.1.2 Projet Biocéramiques

Le troisième article que fait partie de cette thèse a été réalisé dans le cadre d'un projet visant à étudier l'adhésion de protéine sur la surface de biocéramique pour la croissance osseuse. Comme a été déjà dit, c'est une règle (presque) universelle que les biomatériaux soient toujours couverts par les protéines immédiatement après contact avec l'environnement physiologique (Lynch et Dawson, 2008), et cette couche dynamique des protéines (et d'autres biomolécules) est adsorbée à la surface des particules (effet couronne) (Mbeh, D. et al, 2014) . L'effet couronne sur les surfaces des biocéramiques à l'échelle nano est encore peu exploré et grandement inconnu. La caractérisation physico-chimique de surface de ces céramiques bioactives, a été le premier pas afin de mieux comprendre les interactions que contrôle la formation de la couronne et, par conséquent, comment les comprendre la formation du corona d'une liaison stable entre l'implant et l'os hôte.

2.2 Objectifs de la thèse

2.2.1 Objectif principal

L'objectif principal de cette thèse est de faire une étude au niveau nanométrique de la composition physico-chimique des surfaces de biomatériaux utilisés pour la délivrance de médicaments.

2.2.2 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques du projet ont été développés en prenant en considération:

- La caractérisation physico-chimique de la surface au niveau nanométrique des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées pour la délivrance de NO à la paroi pulmonaire.

- La caractérisation morphologique de nanoparticules et leurs agglomérations utilisant la microscopie électronique à balayage et à transmission.
- La caractérisation complète de biomatériaux utilisés dans la fabrication des micro-clusters, qui vont porter les nanoparticules jusqu'à l'intérieur des poumons. Cette caractérisation comprend les aspects physico-chimique et morphologique.
- Les corrélations entre les caractéristiques de surface et les tests de biocompatibilité, soit des échantillons de nanoparticules, soit des biomatériaux utilisés pour faire la délivrance de ces nanoparticules.
- Les analyses de la surface au niveau nanométrique des biocéramiques utilisées pour la croissance osseuse.

2.3 Synthèses des articles

2.3.1 Article 1

Dans cette étude, nous avons analysé la reproductibilité pendant la fabrication de trois types de nanoparticules : oxyde de fer revêtu par l'acide oléique ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$), oxyde de fer enrobé revêtu par l'oxyde de silicium ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) ou par l'oxyde de silicium plus silane ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$). La production de nanoparticules pour la délivrance de médicaments doit être faite avec un degré élevé de reproductibilité, afin que la composition et les propriétés de la surface du dispositif médical soient toujours identiques. Il faut avoir toujours cette garantie pour s'assurer que les résultats des tests biologiques effectués sur un nombre limité de lots de nanoparticules sont applicables à tous les lots fabriqués.

Les échantillons suivants ont été analysés : trois lots de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, trois lots de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, et dix lots de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$. L'analyse physico-chimique a été faite utilisant surtout la Spectroscopie photoélectronique par rayon X (XPS). La Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée comme technique complémentaire. La microscopie à balayage (SEM) a été employée pour analyser la morphologie et la taille des nanoparticules.

Comme résultat, nous avons constaté que la surface de nanoparticules montrait des variations chimiques lot-à-lot. Il n'y avait aucune reproductibilité entre au moins deux lots de nanoparticules, pas en un était trouvé à avoir la même chimie de surface. p

2.3.2 Article 2

Le deuxième article a été réalisé aussi dans le cadre du projet pour la délivrance de NO. Le chitosane a été choisi pour le véhicule pour la délivrance de nanoparticules fonctionnalisées par NO. Même si le chitosane possède des propriétés exceptionnelles d'un polymère biocompatible, biodégradable, non toxique, et autoadhésif, il est important de le stériliser avant de le mettre en contact avec les tissus humains. La stérilisation avec l'oxyde d'éthylène est une des techniques fréquemment utilisées pour ce type de biomatériaux. Cette méthode de stérilisation a des avantages tels que l'efficacité à basse température, haute pénétration, et la compatibilité avec une large gamme de matériaux.

Les surfaces des trois types de chitosane, différant seulement dans leurs degrés de désacétylation, et de carboxyéthyl chitosane (CEC), ont été caractérisés chimiquement par XPS, TOF-SIMS, Diffraction des rayons X et FTIR, à la fois avant et après stérilisation à l'oxyde d'éthylène. Selon les résultats, il paraît probable qu'il y a eu une légère modification chimique de la surface a été produite pendant le processus de stérilisation.

Cependant, la cytotoxicité n'était pas affectée. Les chitosanes avant et après contact avec l'oxyde d'éthylène ont été évalués en utilisant le test de biocompatibilité. La viabilité des cellules a été évaluée par le contact direct entre les particules de chitosane et des cellules épithéliales humaines A549 par les tests de thiazole de méthyle tétrazolium et lactate déshydrogénase. Les résultats ont démontré que tandis que les modifications de la surface causée pendant la stérilisation ont apporté de changements dans les résultats de biocompatibilité, tous les échantillons se sont révélés être biocompatibles et non toxiques avant et après la stérilisation.

2.3.3 Article 3

Le troisième article avait pour but comprendre la nano-surface des biocéramiques utilisées pour la croissance osseuse notamment le phénomène de corona (adsorption des protéines sur des

céramiques). La nature des biomatériaux et de leurs caractéristiques de surface jouent un rôle important dans la détermination de l'adaptation de l'os pour le matériau de l'implant. La réactivité de la surface est une des caractéristiques communes des céramiques bioactives sur l'os, elle contribue à leur capacité de liaison à l'os et leur effet sur l'amélioration de la formation du tissu osseux. Pendant l'implantation, les réactions se produisent à l'interface biocéramique-tissu qui conduit à des changements des caractéristiques de la surface de la biocéramique implantée et aussi les tissus à l'interface. Avec les céramiques bioactives, les réactions de surface ont lieu après immersion dans les liquides biologiques et ces réactions incluent: dissolution, reprécipitation et d'échange d'ions en association avec l'adsorption des protéines qui se produisent à la surface de céramique bioactive.

Les phosphates de calcium, tels que hydroxyapatite de calcium (HA), et de calcium biphasique (BCP) et β -tricalcique (β -TCP) de phosphate ont été caractérisés par spectroscopie de photoélectrons rayons X, diffraction des rayons X, la microscopie électronique à balayage, infrarouge à transformée de Fourier, la spectroscopie de masse d'ions secondaires à temps de vol et la granulométrie laser.

Comme résultats, le XPS a montré la présence de contamination de carbone aux surfaces de tous les échantillons, et a montré aussi que les rapports Ca / P et O / Ca dans les couches externes de l'ensemble des échantillons sont différents de ceux attendus. Avec la déconvolution des pics XPS, les biocéramiques ont révélé que le β -TCP et BCP sont distincts dans les intensités relatives des leurs pics d'oxygène. Les rapports d'intensité entre $\text{PO}_3^- / \text{PO}_2^-$ et $\text{CaOH}^+ / \text{Ca}^+$ analysés par TOF-SIMS ont été utilisés pour distinguer entre les échantillons, et ont aussi démontré que le fragment OH, présent dans tous les échantillons, ne se forme pas au cours de la fragmentation, mais existe à la surface de l'échantillon, probablement comme un contaminant. SEM a révélé clairement que BCP est une matrice de la microstructure macro-organisée, donnant un aperçu de la composition spécialement choisi de la BCP qui offre à la fois un échafaudage adéquat et une bonne porosité de croissance osseuse.

CHAPITRE 3 CORE-SHELL NANOPARTICLES AS PRODRUGS: POSSIBLE CYTOTOXICOLOGICAL AND BIOMEDICAL IMPACTS OF BATCH-TO-BATCH INCONSISTENCIES

R. França^a, X.-F. Zhang^b, T. Veres^b, L'H. Yahia^c and E. Sacher^d

Journal of Colloid and Interface Science, 389(1): 292-297, 2013

a. Department of Restorative Dentistry, D232 Dental Building, University of Manitoba, 780 Bannatyne Avenue, Winnipeg MB, Canada, R3E 0W2

b. Industrial Materials Institute, National Research Council of Canada, 75 Boul. de Mortagne Boucherville, QC, Canada, J4B 6Y4

c. Laboratory for Innovation and Analysis of Bioperformance, École Polytechnique, C.P. 5079, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada H3C 3A7

d. Regroupement Québécois de Matériaux de Pointe and Département de Génie Physique École Polytechnique C.P. 5079, succursale Centre-Ville Montréal, QC, Canada H3C 3A7

3.1 Abstract

Numerous samples of magnetite@silica and magnetite@silica@silane core-shell nanoparticles, previously used as prodrugs, were prepared by an experienced chemist, using the same identical equipment and the same lots of reagents. Their surface analyses showed batch-to-batch chemical variations: no two batches were found to have the same surface chemistries, showing unexpected Si-O bond scission and amine oxidation. Because the preparations used reactions recognized to be mild, and bond scission and oxidation are not found for similar reactions on larger surfaces, the Fe₃O₄ nanoparticles that form the nanoparticle core appear to have acted as catalysts for these side reactions. The intended use of these nanoparticles, as drug carriers, is discussed in terms of cytotoxicological and biomedical consequences.

3.2 Highlights

- solvent-produced magnetite@silica and magnetite@silica@silane core-shell nanoparticles were shown to undergo unexpected reactions.
- these reactions include Si-O bond scission and amine oxidation.
- these reactions differ, in scope and extent, from batch to batch, despite being produced by the same experienced chemist, using the same conditions, equipment and bottles of reagents.
- the risks of using such nanoparticles as prodrugs are discussed.

3.3 Introduction

The reader is asked to consider the following situation: Laboratory A produces a new nanoparticle (NP) to be used as a prodrug, and sends it to Laboratories X and Y, for cytotoxicological testing; a comparison of the test results from these laboratories indicates major cytotoxicological disagreements. In an effort to understand the disparity, Laboratory A repeats the synthesis, again sending samples to Laboratories X and Y. Again, the results show major disagreements, not only between laboratories but also between each laboratory's results on the first and second samples.

It should, by now, be clear to the reader that this is not at all a hypothetical situation. The published literature is filled with papers in which ostensibly identical samples give noticeably different cytotoxicological results. Some of this disparity may be imputed to the use of different protocols for a given cytotoxicological test, to the use of different cell culture media, etc. However, such differences cannot explain disparities between presumably identical samples tested in the same laboratory. Such differences strongly imply that supposedly identical samples, prepared by the same person, with the same apparatus, employing the same procedure, and using reactants from the same bottle, are not, in fact, identical. Because it is the NP surfaces that contact the cell culture medium (or, ultimately, body fluids, in the case of prodrugs), these results indicate that the surface chemistry of the NPs is subject to perceptible variations. This further

implies that, in the production of these NPs, the “simple” reactions used, carried out under “mild” conditions, are not simple nor are the conditions mild. This presents a serious situation, since it is essential that the surface chemistries of NPs used as prodrugs be both predictable and invariant from batch to batch.

We have recently been fabricating, and cytotoxicologically testing, magnetite core-shell (magnetite@silica and magnetite@silica@silane) NPs [1,2]; such NPs have been the subject of many previous studies, particularly as prodrug candidates. Because it is generally understood that the characteristic parameters of nanomaterials may change over time, especially during the manufacturing process, we were concerned as to the extent that this occurred in our case. It rapidly became evident that, while our cytotoxicological results were comprehensible for any given batch, batch-to-batch consistency was absent, prompting us to undertake an extensive chemical analysis of our NP surfaces.

This was principally done using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), a highly surface-sensitive, non-destructive technique. The XPS probe depth ($3 \times$ the attenuation length) ranges from ~ 4 -5 nm for C, N and O, to ~ 8 nm for Si, appropriate for the chemical analysis of the outer layers of the shells of these NPs. Additionally, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used for chemical group confirmation; a distinct advantage of this latter technique is the fact that magnetite does not have a vibrational spectrum in the region of interest.

3.4 Experimental

The fabrication and properties of the magnetite@silica and magnetite@silica@silane NPs have recently been discussed in detail [1,2]. Briefly, magnetite@oleic acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@OA}$) was produced by the well-known decomposition of $\text{Fe}(\text{CO})_5$ in octyl ether-oleic acid, and precipitated in ethanol. When added to alkaline tetraethoxysilane (TEOS), the OA is replaced by a SiO_2 layer, ~ 15 nm thick, to give magnetite@silica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$, Figure 3.1). Further exposure to the silane orthoester, N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane (AEAP3), resulted in the formation of a second shell, \sim another 15 nm thick, to give magnetite@silica@silane

($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$, Figure 3.2). There is no doubt that the NP cores are magnetite nanocrystals [1-3].

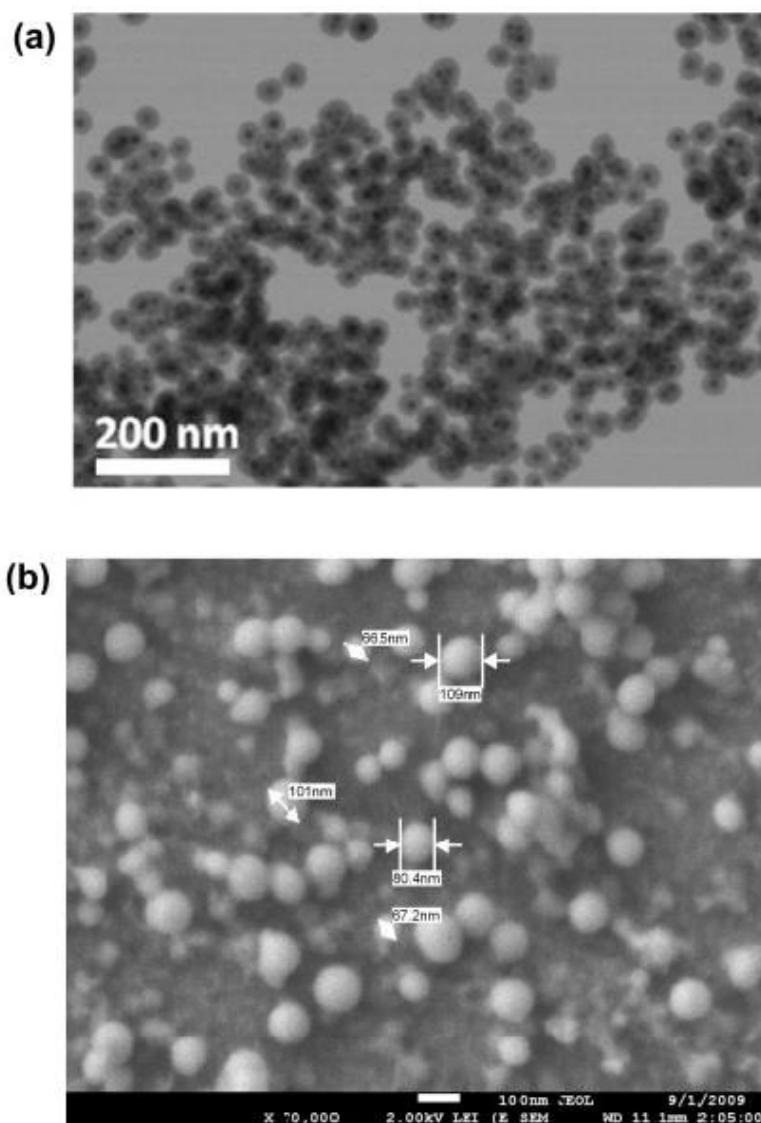


Figure 3.1 Photomicrographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; (a) bright field TEM: cores are visible, (b) SEM: surface structure is visible

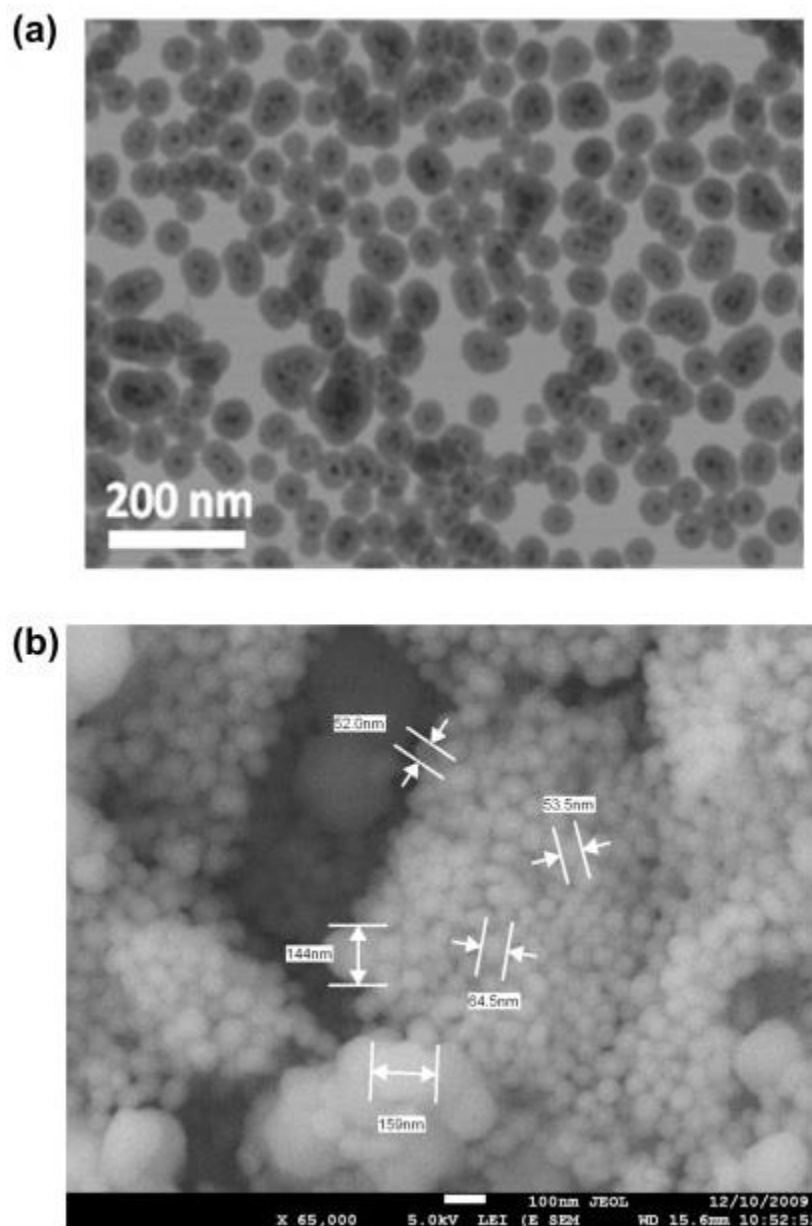


Figure 3.2 Photomicrographs of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$; (a) bright field TEM: cores are visible, (b) SEM: surface structure is visible.

The NP surfaces were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), using a VG ESCALab 3 Mk II that employed non-monochromated Al $K\alpha$ radiation (1486.6 eV, with an instrument resolution of 0.85 eV), at a power setting of 300 W. The base pressure during scanning was below 1×10^{-9} Torr. Electrons were detected at a perpendicular takeoff angle, using

steps of 0.05 eV, and spectra were analyzed using the VG Advantage software, using peak widths previously determined in our laboratory on similar materials. Samples were prepared by pressing the NPs onto an adhesive Cu ribbon, completely covering the Cu; no evidence of Cu was seen in the XPS survey scan, and the C1s spectrum obtained differed from that of the bare ribbon adhesive. Because of the abundance of unattributable C1s peaks, energy normalization was accomplished by setting the highest energy Si2p peak, presumed to be due to Si bonded to four O, as in SiO₂, at 103.5 eV. In no case was the Fe2p spectrum detected, indicating the presence of shells thicker than the attenuation length of the Fe2p emission (~ 3 nm), as previously indicated [1,2].

FTIR spectra were obtained on a Nicolet FTIR spectrometer, in the range 600-4000 cm⁻¹. The spectrometer resolution was set at 4 cm⁻¹, and 240 spectra were co-added to improve S/N.

3.5 Results

In preparation for the magnetite NP fabrications reported here, we earlier characterized several commercially produced Fe oxides; these included FeO, α -Fe₂O₃, γ -Fe₂O₃, FeO(OH) and Fe₃O₄ [2]. Although X-ray diffraction showed [1-3] that the interiors of the NPs we produced were clearly composed of Fe₃O₄, the Fe2p XPS spectra of Fe₃O₄@OA produced as the first step in producing our core-shell NPs (not shown) demonstrated that the NP surfaces did not correspond to any of the oxides we previously determined. It quickly became clear that the Fe₃O₄@OA outer layers detected by XPS contained incompletely reacted material. Despite this, the NPs were superparamagnetic and were capable of accepting a silica shell [1,3]. It became a concern as to whether the deposited shells (@SiO₂ and @SiO₂@NH₂) might also suffer from partial reaction. As noted earlier, all the shells were of sufficient thickness to obviate detection of the underlying Fe-containing core.

Table 3.1 C1s peaks detected for Fe₃O₄@SiO₂

Samples		C1s Peaks		
1	282.8	284.2	285.8	287.5
2	281.9	283.0	284.3	
3	278.6	279.7		

Table 3.2 O1s peaks detected for Fe₃O₄@SiO₂.

Sample		O1s Peaks	
1		531.9	532.6
2		531.9	532.4
3	530.4	531.7	532.8

Table 3.3 Si2p peaks detected for Fe₃O₄@SiO₂.

Sample		Si2p Peaks	
1		102.6	103.5
2		102.6	103.5
3	101.6	102.6	103.5

Fe₃O₄@SiO₂

Our C1s, O1s and Si2p peak positions for three Fe₃O₄@SiO₂ samples are found in Tables 3.1-3.3, respectively, and their relative concentrations are found in Figure 3.3; included in the figure are two contaminants, each found once. With the FTIR spectrum of Fe₃O₄@OA, in Figure 3.4a, for comparison, a corresponding spectrum of Fe₃O₄@SiO₂ is found in Figure 3.4b. As shown by the disappearance, from Figure 3.4b, of the carbonyl deformation at ~ 1700 cm⁻¹ in Figure 3.4a, Fe₃O₄@SiO₂ no longer contains oleic acid, which has been displaced on reaction with TEOS. The large amount of C, found in the XPS spectra (Table 3.1) and seen in Figure 3.3, is probably

partially due to adventitious carbon, as is some of the O in Figure 3.3 (i.e., some of the adventitious carbon is oxidized); the reaction of TEOS with displaced oleic acid cannot contribute to the presence of C and O because, as Figure 3.4b makes clear, the carbonyl peak is no longer present.

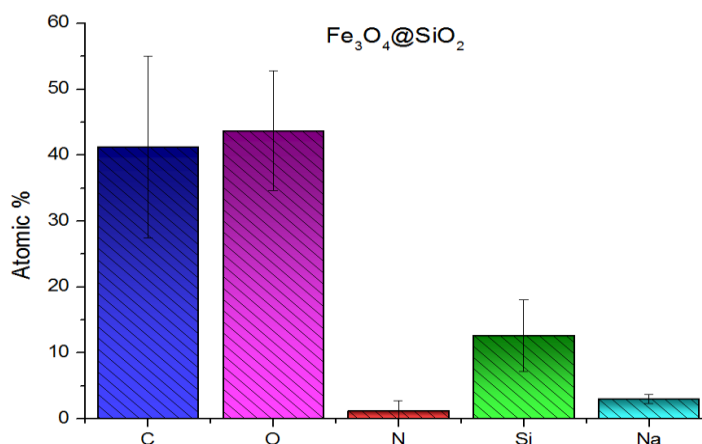


Figure 3.3 Atomic percentages of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Since the C1s spectrum, and some fraction of the O1s spectrum, are due to contamination, of which we cannot presently take account, we rely on the Si2p spectrum, in Table 3.3, to follow the deposition of the @SiO₂ shell. That table shows clear evidence for the existence of Si bonded to two (101.6 eV) and three (102.6 eV), as well as to four (103.6 eV) O atoms. In support of this evidence of Si-O bond scission, Figure 3.4b contains a shoulder at $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$, due to unexpected Si-C stretching [4,5], which is confirmed by a peak at $\sim 798 \text{ cm}^{-1}$, due to Si-C deformation.

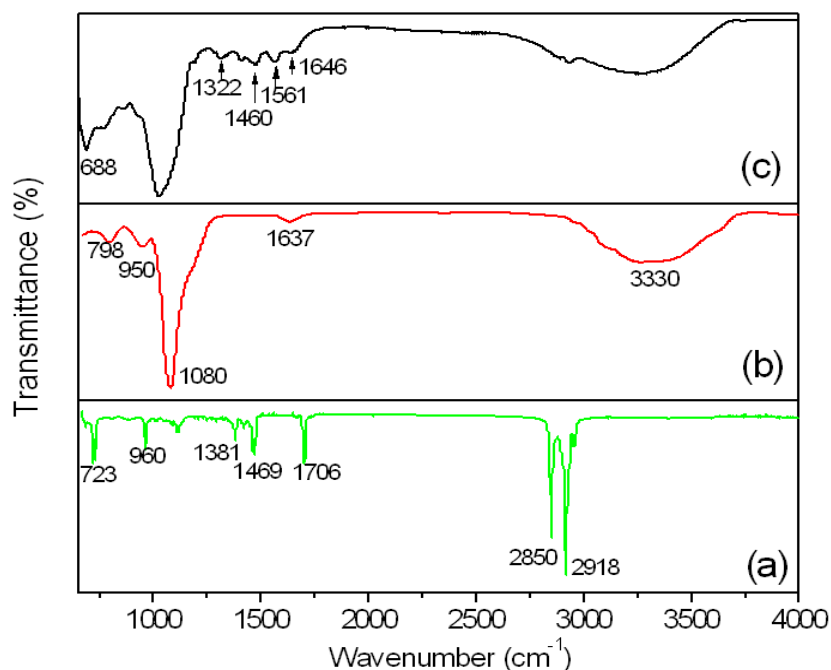


Figure 3.4 FTIR spectra of (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{OA}$, (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

Our C1s, O1s, N1s and Si2p peak positions for ten $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ spectra are found in Tables 3.4-3.7, respectively, and their relative concentrations are found in Figure 3.5; again, contaminants are included. Again, large variations in relative concentrations are found.

Table 3.4 C1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

Sample	C1s Peaks					
1			283.8	284.9	285.8	286.6
2	281.0	282.2	283.6	285.2		
3		282.5	284.1	285.0	286.0	
4		283.5	284.4	285.4		
5			284.2	285.5		287.3
6		283.9	284.9	285.9		
7		283.0	284.4	285.6	287.1	288.5
8		283.5	284.4	285.4	286.8	
9		282.0	284.3	285.3	286.4	288.0
10	280.2	283.9		285.0	286.0	

Table 3.5 O1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

Sample	O1s Peaks			
1		530.5	532.0	532.9
2	529.2	530.9	532.0	533.1
3		530.1	531.6	532.4
4			531.2	532.0
5		530.6	531.5	532.3
6			531.5	532.7
7		530.7	531.9	533.2
8		531.0	531.9	532.8
9		530.5	531.9	532.8
10		530.6	531.9	532.8

Based on the fact that both C1s and O1s spectra have sources in both contaminant layers and in the @NH_2 shell, which cannot presently be distinguished, we consider only the N1s (Table 3.6) and Si2p (Table 3.7) spectra in following the deposition of the @NH_2 shell. The N1s component peaks, in Table 3.6, number either two (for 5 samples) or three (for the remaining 5 samples), while only one component was expected (both primary and secondary amines appear at the same energy, ~ 398 eV).

Table 3.6 N1s peaks detected for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

Sample	N1s Peaks		
1	398.2	399.3	400.2
2	397.7	398.7	400.0
3	398.7	399.8	400.9
4	397.8	398.7	400.0
5		399.2	400.1
6	397.7	399.2	400.7
7		399.3	400.4
8	398.4	399.7	
9		399.1	400.1
10	398.5	399.5	

Table 3.7 Si2p peaks detected for Fe₃O₄@SiO₂@NH₂

Sample	Si2p Peaks			
1		101.6	102.6	103.5
2	100.7	101.6	102.6	103.5
3		101.6	102.6	103.5
4		101.6	102.6	103.5
5		-	-	-
6		101.6	102.6	103.5
7			102.4	103.5
8		101.6	102.5	103.5
9			102.5	103.5
10		101.6	102.6	103.5

Samples 3, 5, 7 and 9 do not have a peak at that energy. Other peaks appear near 399, 400 and 401 eV, suggesting escalating amine oxidation. In support of such oxidation, the FTIR spectrum, in Figure 3.4c, contains a peak at $\sim 1561\text{ cm}^{-1}$, due to N-O stretching, and a corresponding peak at $\sim 1322\text{ cm}^{-1}$, due to N-O deformation.

As with the Fe₃O₄@SiO₂ samples, the Fe₃O₄@SiO₂@NH₂ samples show multiple Si2p peaks, indicating the presence of Si bonded to two (101.6 eV) and three (102.6 eV), as well as to four (103.6 eV) O atoms; in addition, sample 2 manifests a peak at $\sim 100.7\text{ eV}$, implying Si bonded to one O atom. It should be noted that sample 5 shows no evidence of Si, despite the fact that it manifests two N1s peaks, at positions indicating oxidation; this suggests the possibility of N transfer from the silane. Fe, too, is absent, indicating that the shell, composed of C, is several nm thick. Again, the shoulder, at $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$, in the FTIR spectrum of Figure 4.4c, and the peak, at $\sim 798\text{ cm}^{-1}$, confirm the presence of Si-C. Thus, the Si-O bond has undergone scission, whether in the @SiO₂ shell, the @NH₂ shell, or both.

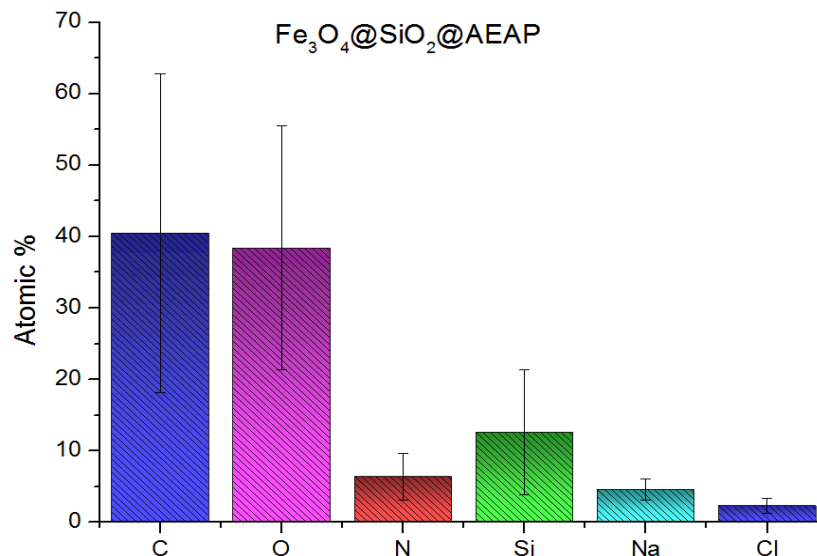


Figure 3.5 Atomic percentages of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$.

3.6 Discussion

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

The Stöber process [6], proposed in 1968, was used to deposit the @SiO_2 shell. It involves the basic hydrolysis of TEOS in aqueous alcohol at room temperature, and has always been considered a mild reaction. When its chemistry was discussed in the recent literature [7], it was pictured as the hydrolysis of $\text{Si-O-C}_2\text{H}_5$ to give Si-OH , followed by condensation and loss of water, to form Si-(O)_4 ; this is seen in Figure 3.6a. Si-O fragmentation has never been considered, nor, after extensively searching the literature, does it appear that any reason was ever presented to do so. However, our present data show that there was extensive contamination by adventitious carbon, which appears to have reacted with the TEOS during shell formation. Further, neither the component species nor their relative concentrations (to be discussed shortly) remain constant from batch to batch.

The fragmentation noted in Table 3.3 has been confirmed by the FTIR results mentioned earlier. Because the Si-O bond has an energy of $\sim 450 \text{ kJ mol}^{-1}$ and the C-C bond, an energy of $\sim 350 \text{ kJ}$

mol^{-1} , such fragmentation is not expected to occur at room temperature, under “mild” conditions, except through the intermediation of a catalyst, such as Fe_3O_4 NPs [8].

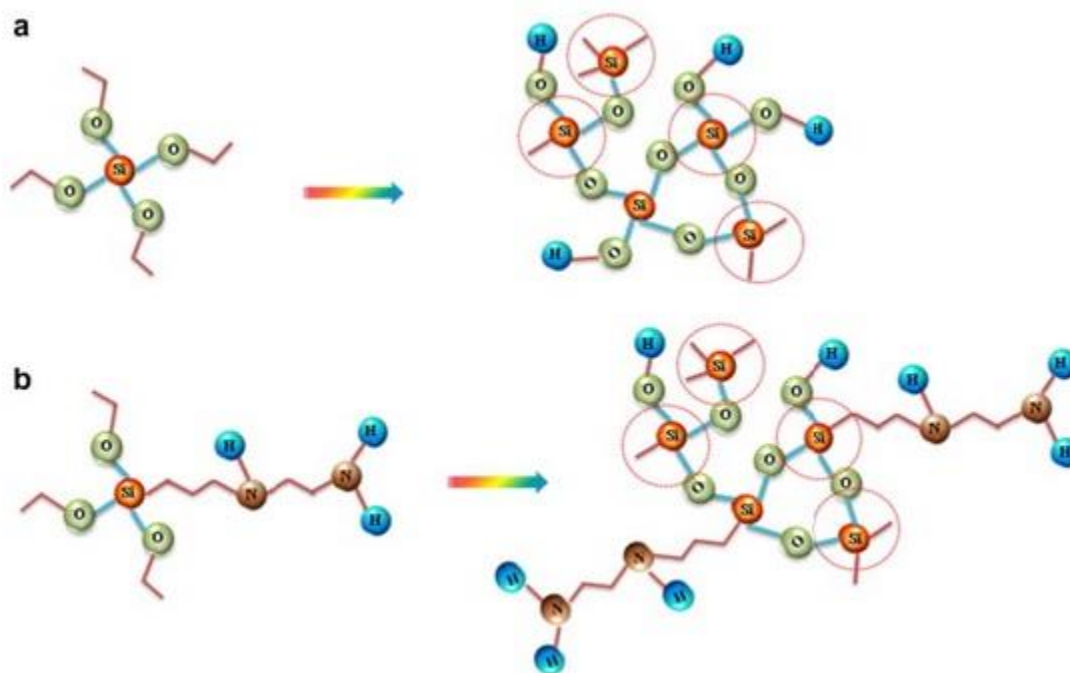


Figure 3.6 Hydrolysis of (a) TEOS and (b) silane

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$

The hydrolysis of silane orthoesters $[(\text{RO})_3\text{-Si-R}'\text{-Z}]$, where R and R' are organic groups and Z is a functional group, a process commercialized in the late 1930s, has always been accepted as mild, and to occur in a fashion similar to that of TEOS hydrolysis, as seen in Figure 3.6b. Indeed, in a recent paper on the use of an orthoester similar to ours [9], deposited onto a flat substrate, XPS revealed that no Si-O scission had occurred, although the N1s spectrum manifested two peaks, the higher energy component of which was attributed to hydrogen-bonded NH_2 .

Table 3.8 XPS peak positions of primary amines and their oxidation products

Group^a	N1s (eV)^b
Primary amine	~398
Nitrile	~398
Hydroxylamine (Nitrilo)	~399
Oxime	~400
Nitroso	~401.5
Nitro	~406

a. Reference 10.

b. Reference 11.

SciFinder Scholar [10], queried with the phrase, “primary amine oxidation”, returned articles indicating the oxidation products possible in our case; these are found in Table 3.8. The binding energy values found in the table come from the NIST XPS Database (SRD 20, version 3.5) [11]. The results of a similar query for “secondary amine oxidation” are found in Table 3.9. The silane orthoester used, N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl trimethoxysilane, colloquially known as AEAP3, has both 1° and 2° amines.

Table 3.6 shows that the N1s spectrum has peaks concentrated around, 398, 399, 400 and 401 eV. Given that the binding energy was normalized to the Si(O)₄ peak, at 103.5 eV (this peak has sometimes been set to other energies between 103.0-104.0 eV), we take the peaks at 398-399 eV to be unoxidized amine, and those at higher binding energies to be due to progressively higher oxidation states. What is clear from Tables 3.8 and 3.9 is that these higher binding energy peaks represent *mild* oxidation states (e.g., oxime and/or hydroxylamine).

Table 3.9 XPS peak positions of secondary amines and their oxidation products

<u>Group^a</u>	<u>N1s (eV)^b</u>
Secondary amine	~398
Imine	~398
Hydroxylamine (Nitrilo)	~399
N-oxide (Nitron)	~403

a. Reference 8.

b. Reference 9.

The oxidation and fragmentation noted in Tables 3.6 and 3.7, respectively, have been confirmed by FTIR, as noted earlier. Here, too, as in the case of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, above, the occurrence of the highly energetic processes of Si-O scission and, additionally, amine oxidation, argue for the presence of catalytic intermediation.

Batch-to-batch inconsistency of relative concentrations

The relative concentrations of component peaks, even for batches that give qualitatively similar results, are vastly dissimilar. Consider, for example, batches 1 and 4 of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$. Each exhibits three Si2p and three N1s peaks, at about the same positions. Despite this, the Si : N atomic ratio is 2.79 : 1 for batch 1 and 4.44 : 1 for batch 4. Further, the $\text{Si}(\text{O})_2:\text{Si}(\text{O})_3:\text{Si}(\text{O})_4$ peak ratio is 1 : 4.23 : 4.24 for batch 1, and 1 : 3.56 : 1.68 for batch 4, while the three N peaks, in order of increasing binding energies, are in the ratio 1 : 1.55 : 0.74 for batch 1 and 1 : 1.19 : 0.52 for batch 4. Similar comparisons may also be made with other sample pairs and, in each case, batch-to-batch consistency is absent: even in the case where the number of peaks and their energy positions are the same, their ratios and relative concentrations are substantially different. It appears that the extents of chain scission and oxidation are essentially random. A Google search [12], using the term, “batch-to-batch consistency in nanoparticle production”, returned “about 475,000 results”. A serious perusal indicated that batch-to-batch consistency generally referred to “specifications that include the size distribution, optical properties, hydrodynamic diameter, zeta potential, and solution pH of the nanoparticles” [13], although XPS has occasionally been used to compare NP surfaces: a recent study of Si nanowire preparation [14] found a variation in surface hydroxyl groups, imputed to humidity variations during preparation.

Implications for drug delivery

The literature is replete with papers on magnetite core-shell NPs, principally touted for drug delivery. Several that have recently been published are found in references [7, 15-17]. Despite the pressing need for such information, and the risks involved, few have been subjected to cytotoxicological studies and none, to batch-to-batch reproducibility studies. We outline such risks below.

The drug production process must be controlled and reproducible, in order to ensure that the nanomaterials contained in the medical device are rigorously identical. It is the only way to ensure that the biological risk evaluation subsequently carried out on the medical device containing the nanomaterials is valid for all of the batches produced.

Further, drug delivery, itself, is predicated on the use of non-hazardous carriers delivering a known quantity of drug. To insure that the carriers are non-hazardous, cytotoxicological studies are carried out. As noted in the Introduction, the literature is replete with results that are inconsistent from laboratory to laboratory, and from batch-to-batch. We now begin to understand why this is so.

While the use of Fe_3O_4 in NPs is US Food and Drug Administration- and European Medicines Agency-approved, the use of our functionalized NPs as prodrugs presents a problem because of the inconsistency of the surface chemistry. Let us consider the use of the NH_n groups for drug bonding: in the example used above, the NH_n content of batch 1 is 30% of total N and that of batch 4, 37%. Among all the batches, the NH_n variation is extensive: for batch 5, it is 0% and for batch 10, 51%. Clearly, one cannot construct a prodrug from our NPs through NH_n bonding. It appears that, should it be necessary to use Fe_3O_4 NPs for magnetic drug targeting, the outer surface would need to be covered, in a repeatable fashion, with a non-toxic layer that is stable under use conditions (e.g., PEGylation, using functionalized PEG), and the chemically consistent surface thus obtained used for prodrug formation.

Implications for toxicity

Many research projects have attempted to fill gaps in our knowledge of the potential toxicity of nanostructures, but current data are incomplete and, all too often, inconsistent. The surface chemistry of NPs has been found to be of paramount importance for protein adsorption, and its effect on cell toxicity. Methodologies to characterize and develop all aspects of the potential toxicity of prodrugs are still at the developmental stage. The interpretation of inter-laboratory

data remains difficult, partly due to a shortage of reference nanostructures and protocols, while the relevance of some toxicological tests used for conventional materials has yet to be established and validated for nanomaterials. Consequently, adding those technical weaknesses to our findings of batch-to-batch inconsistency, the evaluation of the biological risks, in the use of nanostructures as prodrugs, remains a formidable problem.

3.7 Conclusions

Our study of the surface chemistry of core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ NP structures, using multiple samples, manufactured identically, by the same experienced chemist, has shown the presence of Si-O bond scission and the mild oxidation of NH_n groups, marked by batch-to-batch variations. Since similar reactions are not reported to occur on large, flat surfaces, it appears that the presence of Fe_3O_4 NPs catalytically promotes the reactions found.

3.8 Acknowledgment

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Nitrox Medical Devices for funding.

3.9 References

1. D. A. Mbeh, R. França, Y. Merhi, X.-F. Zhang, T. Veres, E. Sacher, L'H. Yahia J. Biomed. Mater. Res. Part A 100 (2012) 1637-1646.
2. S. Poulin, R. França, L. Moreau-Bélanger, E. Sacher J. Phys. Chem. C 114 (2010) 10711-10718.
3. X.-F. Zhang, L. Clime, H. Roberge, F. Normandin, L'H. Yahia, E. Sacher, T. Veres J. Phys. Chem. C 115 (2011) 1436-1443.
4. L. J. Bellamy LJ. The Infra-red Spectra of Complex Molecules, Wiley, New York, 1959, Chapter 20.

5. N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, New York, Third Edition, 1980, Chapter 13.
6. W. Stöber, A. Fink, E. Bohn J. Colloid Interface Sci. 26 (1968) 62-69.
7. B. J. Jankiewicz, D. Jamiola, J. Choma, M. Jaroniec Adv. Colloid Interface Sci. 170 (2012) 28-47; see Figure 3.3 and associated text.
8. A. Z. Moshfegh J. Phys. D: Appl. Phys. 42 (2009) 233001.
9. R. G. Acres, A. V. Ellis, J. Alvino, C. E. Lenehan, D. A. Khodakov, G. F. Metha, G. G. Andersson J. Phys. Chem. C 116 (2012) 6289-6297.
10. <https://scifinder.cas.org>, queried on July 15, 2010.
11. http://srdata.nist.gov/xps/class_org.aspx, queried on July 15, 2010.
12. <http://www.google.ca>, queried on April 24, 2012.
13. <http://nanocomposix.com/technology/gold>, queried on April 24, 2012.
14. M. F. Beaux II, N. J. Bridges, M. DeHart, T. E. Bitterwolf, D. N. McIlroy Appl. Surf. Sci. 257 (2011) 5766-5771.
15. N. Erathodiyil, J. Y. Ying Accts. Chem. Res. 44 (2011) 925-935.
16. M. Mahmoudi, Y. Serpooshan, S. Laurent Nanoscale 3 (2011) 3007-3026.
17. M. Colombo, S. Carregal-Romero, M. Y. Casula, L. Gutiérrez, M. P. Morales, I. B. Böhm, J. T. Heverhagen, D. Prosperi, W. J. Parak Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 4308-4334.

CHAPITRE 4 THE EFFECT OF ETHYLENE OXIDE STERILIZATION ON THE SURFACE CHEMISTRY AND *IN-VITRO* CYTOTOXICITY OF SEVERAL KINDS OF CHITOSAN

Rodrigo França^a, Taraneh Djavanbakht Samani^b, Doris A. Mbeh^b, Canh Le Tien^c, Mircea A. Mateescu^c, L'Hocine Yahia^b, Edward Sacher^{b,d}

Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials 101B: 1444-1455.

^aDepartment of Restorative Dentistry, D232 Dental Building, University of Manitoba
780 Bannatyne Avenue, Winnipeg MB, Canada, R3E 0W2

^bLaboratoire d'Innovation et d'Analyse de Biopformance, École Polytechnique de Montréal
C.P. 5079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada

^cDépartement de Chimie and Centre Pharmaqam Université du Québec à Montréal C.P. 8888,
Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8, Canada

^dRegroupement Québécois de Matériaux de Pointe and Département de Génie Physique École
Polytechnique de Montréal C.P. 5079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7
Canada

4.1 Abstract

The surfaces of three chitosans, differing only in their degrees of deacetylation, and of carboxyethyl chitosan were chemically characterized by XPS, TOF-SIMS, XRD and FTIR, both before and after sterilization with ethylene oxide. Unexpected elemental ratios suggest that surface chemical modification occurred during the processing of the original chitin, with further surface modification on subsequent sterilization, despite previous reports to the contrary. Cell viability was evaluated by direct contact MTT and LDH assays between the chitosan particles and A549 human epithelial cells, which demonstrated that the modifications incurred on sterilization are reflected in biocompatibility changes. All the samples were found to be biocompatible and non-toxic before sterilization, and remained so subsequently.

Key words: biocompatibility; chemical modification; chitosan; cytotoxicological evaluation; ethylene oxide sterilization; surface characterization

4.2 Introduction

Chitosan (Ch) is a biocompatible polymer that is biodegradable, nontoxic and self-adhesive. It is primarily composed of 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose repeat units, retaining a small amount of 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose residues, and is the second most abundant and renewable natural polymer after cellulose. It is commonly found in the exoskeleton or cuticles of many invertebrates, and in the cell walls of most fungi and some algae [1]. It is characterized by either the degree of acetylation (DA) of amino groups, or by the degree of deacetylation (DD) of N-acetyl amino groups. When the number of N-acetyl-D-glucosamine units is greater than 50%, the biopolymer is called chitin; when it is lower, the term, chitosan, is used (Fig. 4.1) [1,2]. Chitin and Ch are of commercial interest due to their higher percentage of amine/amide functions, compared to synthetically substituted biopolymers [2], making them attractive for medical use.

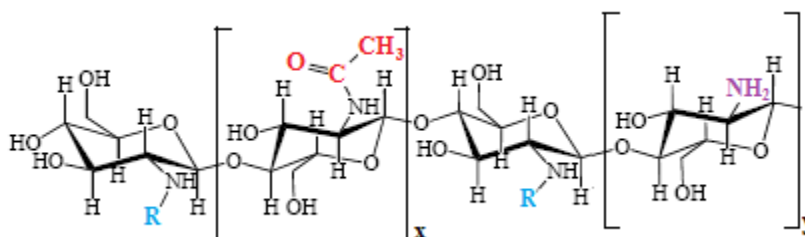


Figure 4.1 Chemical structure of chitin or chitosan.

If R = $-\text{COCH}_3$ and $x > 50\%$, chitin; or if R = H and $y > 50\%$, chitosan

Ch is soluble in aqueous acids but insoluble in neutral or alkaline aqueous media, as well as numerous other solvents, which limits its applicability. The amino group at the highly nucleophilic C2 position may be used to modify Ch, so as to obtain physicochemical or biological properties desired for specific applications. For example, Ch has been modified by glutaraldehyde cross-linking to prepare “intelligent” drug delivery systems [3], by

carboxymethylation for the repair and regeneration of bone tissue [4] and by conjugation with sulfate, as a blood anticoagulant factor activator [5]. Recently, Tran *et al.* [6] treated Ch with acrylic acid in order to obtain carboxyethyl chitosan (CEC), which was used as a matrix for the controlled release of ibuprofen and famotidine; in contradistinction to Ch, CEC is soluble not only in acid, but also in aqueous media with neutral or higher pH values, depending on its degree of carboxyethylation. This solubility, over a larger pH range, is important for various biomedical uses, including gene delivery.

Ch is also widely employed when in contact with corporeal fluids or implanted within the body, where sterilization is required. Several sterilization methods can be used, including autoclaving, ethylene oxide, dry heat, and ultraviolet and γ -radiation [7]. The method chosen must be carefully selected because the physical, mechanical, and biological properties of biomaterials may be negatively affected by it.

Ethylene oxide (EtO) is very useful as a sterilization agent. It proceeds through the direct alkylation of cellular constituents of organisms, leading to denaturation. It has advantages, such as effectiveness at low temperatures, high penetration, and compatibility with a wide range of materials. Nonetheless, it is flammable and explosive, it may produce toxic residues, and it reacts with functional groups, such as the amine in Ch [7]. To reduce both its toxic effects and its flammability, EtO is generally mixed with inert gases, such as fluorocarbons and CO₂. In order to overcome some of its drawbacks, strict rules have been established concerning its use in sterilization, such as those promoted by the American National Standard ANSI/AAMI ST27-1988 [8]. Despite various studies involving the use of Ch and EtO, information about the effects of this sterilization method on the surface properties of the materials remains limited [2].

The aim of the present study is to evaluate the effects of EtO sterilization on Ch and its derivative, CEC, and to establish the relationship between the physicochemical properties of their surfaces and their *in vitro* biocompatibility test results. In particular, the use of X-ray photoelectron spectroscopy, which probes ~ 5 nm of the outer layer of Ch, and TOF-SIMS, which probes its first few monolayers, is designed to aid in the comprehension of our cytotoxicological results obtained when contacting these same outer layers.

4.3 Experimental

Materials

Chitosans

Four kinds of Ch were used in this study: those with DD values of 79% (Ch79), 85% (Ch85), and 95% (Ch95), as well as carboxyethyl chitosan (CEC). They were purchased from Marinard Biotech (Rivière-au-Renard, QC, Canada); CEC was obtained by the carboxyethylation of Ch95, as described below. Concerns over chemical modifications during reprocessing restricted us to using the samples as received. Because of this, the effects of particle size and shape were not considered here. These effects will, however, be discussed in a follow-on paper on the distribution of pro-drug nanoparticles in chitosan microparticles of various sizes.

Cell line and culture medium

The A549 cell line (CCL-185), obtained from ATCC, was used for the proliferation test. It is a human Caucasian lung carcinoma type II epithelial cell, and was grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma–Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco Laboratories) to control bacterial contamination. It was maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air; no contamination was detected during the experiments. The culture medium used was identical to the growth medium.

Reagents

Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen) was used to collect the undamaged cells. The yellow tetrazolium dye used in the MTT test, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-triphenyl tetrazolium bromide, was purchased from Trevigen; both the reagent and the detergent solution are supplied ready for use. The LDH cytotoxicity detection kit was purchased from Roche.

Methods

CEC Synthesis

CEC was obtained by treatment of Ch95 (MW ~ 400 kDa) with acrylic acid, as described by Tran *et al* [6]. Briefly, 10 g of chitosan were dispersed in 490 mL of distilled water, and 10 mL of acrylic acid were added. After 4 h at 80 °C, the final pH of the solution was adjusted to 7.0; the CEC was precipitated with added methanol, collected by filtration, washed 3 times with pure acetone and dried in an incubator at 40 °C for 72 h. The degree of substitution (DS) was confirmed by elemental analysis (Fisons model EA-1108 Element Analyser) as ~ 0.45.

Chitosan Sterilization with Ethylene Oxide (EtO)

All the samples, in the form of powders, were sterilized with EtO; however, only Ch95 and CEC were used for the biocompatibility tests because they, alone, were amenable to homogeneous dispersion in the culture medium. The sterilizations were performed by exposure to Honeywell Oxyfume-30 (30% EtO and 70% CO₂) for 8 h at 40°C and 40–50% relative humidity. An initial vacuum of 400 mm Hg (53.3 kPa) was applied for 15 min, and then 600 mg/L of Oxyfume-30 were added until the chamber reached a pressure of 0.5 kgf/cm² (49.0 kPa). After the incubation period, a 400 mm Hg vacuum was reestablished. The samples were purged with N₂ several times to remove residual EtO, and stored at room temperature for at least 1 week before testing.

Chitosan characterizations

At least four replicates were used in each case.

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Two hundred sixty one FTIR scans of each powder sample were co-added on a Bio-Rad FTS 6000 spectrometer, in the range 4000-400 cm⁻¹, using a He-purged MTEC 300 photoacoustic cell, with the spectrometer resolution set at 4 cm⁻¹.

X-Ray Diffraction (XRD): Analyses were carried out using a PANalytic X'Pert MPD, with Cu K α radiation ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$), generated at 50 kV, 40 mA. The 2θ range, 15-80°, was covered in 0.02° steps, and the diffraction patterns were analyzed using the X'Pert HighScore software accompanying the instrument, with comparisons against standards from the stored JCPDS cards.

X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS): C1s, O1s and N1s spectra of the various samples were obtained on a VG ESCALab 3 Mk II, using non-monochromated Mg K α radiation (1253.6 eV), at a power setting of 300 W, having an instrument resolution of 0.7 eV. When two peaks differ in energy by less than this amount (*e.g.*, C-C and C-NH differ by ~ 0.3 eV), they cannot be separated with confidence; in such a case, they are subsumed into one peak. The samples were deposited onto copper sample stubs, using 2-sided adhesive Cu tape. The base pressure during scanning was less than 1×10^{-9} torr. Electrons were detected at a perpendicular take-off angle, using 0.05 eV steps, and spectra were analyzed using the VG Advantage software. No Cu spectrum was visible, indicating a thick sample deposit.

Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectroscopy (TOF-SIMS): Positive and negative ion spectra, obtained with an ION-TOF IV TOF-SIMS, using a 15 kV Bi $^{+}$ primary ion source, were acquired at masses up to 500. The primary ion dose was maintained at less than 10^{12} ions/cm 2 , so as to ensure static conditions. Positive ion spectra were calibrated to the H $^{+}$, H $_2^{+}$, C $^{+}$, CH $^{+}$, CH $_2^{+}$, CH $_3^{+}$, C $_2$ H $_3^{+}$, C $_2$ H $_5^{+}$, C $_3$ H $_5^{+}$, C $_3$ H $_7^{+}$, C $_4$ H $_5^{+}$, C $_4$ H $_7^{+}$ and C $_4$ H $_9^{+}$ peaks, and negative ion spectra were calibrated to the C $^{-}$, CH $^{-}$, C $_2^{-}$, C $_2$ H $^{-}$, C $_3^{-}$, C $_3$ H $^{-}$ peaks before data analysis. Sample spectra were obtained over an area 50 μ m x 50 μ m, rastered in random mode, 128 by 128 pixels, with an emission current of 1.0 μ A in bunch mode.

Scanning Electron Microscopy (SEM): Photomicrographs were obtained with a JEOL JSM-7600TFE microscope. Samples were deposited onto an amorphous carbon ribbon and, subsequent to the deposition of a layer of amorphous carbon, inserted into the instrument. Images were obtained at a 2 keV accelerating voltage.

Relative dispersibilities of the various types of chitosan in the culture medium

It was initially intended to analyze the biocompatibilities of all the sample dispersions (Ch79, Ch85, Ch95 and CEC) in direct contact with cells, for the purpose of obtaining light microscopy images. However, as mentioned earlier, only the latter two were homogeneously dispersible in

the culture medium; they were added to the medium, at a concentration of 1 mg/mL, with 2 mL of the cell suspension, and were analyzed by light microscopy at 20× magnification. This concentration was used only for obtaining light microscopy images, with various other concentrations used for chitosan preparation, as described below.

Biological assays

Biocompatibility: The biocompatibility studies were performed by direct contact of Ch particles with A549 cells. One hundred μL /well of cell suspension (1.0×10^5 cells/mL) in culture medium were inoculated in the 96-well microplate, and permitted to grow for 24 h, at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. The samples, both before and after sterilization, were suspended in DMEM at various concentrations (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$, a range often used in the literature [9,10], with 0 $\mu\text{g/mL}$ as control, at room temperature. After 24 h, the medium in the microplate containing cells was removed and replaced with the one containing different concentrations of Ch particle suspensions (0-100 $\mu\text{g/mL}$) for another 24 h. Cell viability was determined by both MTT and LDH tests.

MTT: Mitochondria play a critical role in cellular function through aerobic adenosine triphosphate (ATP) production [11]. The methyl thiazole tetrazolium (MTT) assay uses the yellow tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, to measure cell viability through the tetrazolium compound bio-reduction, by viable cells, to a colored formazan product. The conversion in the viable cells is done by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) or nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), catalyzed by dehydrogenase enzymes. The formazan absorbance is measured at 570 nm and is related to the number of viable cells [12]. Following the manufacturer's directions [10], the exposure media containing the Ch solutions were aspirated (cells still adhered to the well bottom) and each well was rinsed with 200 μL of 1% phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen, 10x Gibco Phosphate-Buffered Saline, pH 7.2). One hundred μL of medium were then added to each well, along with 10 μL of MTT reagent. After incubation for 4 h at 37 °C, under 5% CO_2 , 100 μL of Invitrogen Detergent were added to each well to insure the solubilization of the formazan crystals. The plate was held in the dark, at room temperature, and read after 3 hours. The optical

density values were determined at 570 nm, using a Beckman microplate reader. The relative cell viability (%) results were computed by dividing the absorbance values from wells with sampled cells by those from the control wells (*i.e.*, wells with only cells and no Ch).

LDH assay: Lactate dehydrogenase LDH, a stable enzyme present in the cytosol, is released upon cell lysis. This assay permits the determination of compounds that induce alterations in cell integrity. It is based on the measurement of LDH released, from the cytosol of dead or plasma membrane-damaged cells, and was performed on the culture supernatant from the plates used for the MTT assay. After the incubation of cells with the different types of chitosan, the supernatants (100 µl) were transferred to a 96-well plate for LDH assay, and the cells that remained in the plates were used for the MTT assay. Equal volumes of the reaction mixture were added to each well. Absorbance was measured at 492 nm, and the cytotoxicity, in %, was calculated relative to Triton X-100, as the high control (100% cytotoxicity), and the cells in the culture medium, as the low control (0% cytotoxicity), as follows:

$$((S-C) / (T-C)) \times 100,$$

where S is the measured value, C is the low control value, and T is the high control value.

4.4 Results

Morphological characterization

XRD: As noted earlier, Ch can present different crystalline patterns. Native chitin has three anhydrous crystalline polymorphs, α , β , and χ , depending on its source [13,14]. The α -chitin, from which our samples are derived, the most abundant of the three polymorphs, has a tightly compacted orthorhombic cell, formed by alternating sheets of parallel and antiparallel chains. The β -chitin adopts the parallel form with a monoclinic unit cell, and the χ -chitin structure has not been completely identified [14]. The XRD patterns of all our samples, before sterilization

(Fig. 4.2), present a peak at $2\theta = 20^\circ$, and the degree of crystallinity increases with the DD value. This difference in crystallinity may reflect the fact that Ch chains with higher degrees of deacetylation are more compact, with a greater number of amine groups facilitating hydrogen bonding [15] and crystal formation. An additional peak appears at $2\theta = 10^\circ$, possibly indicating another crystal form. This structural parameter influences both physicochemical [16] and biological properties [17]. The XRD patterns do not change on sterilization. This is because, as shown below, EtO affects only the outer surface of the sample.

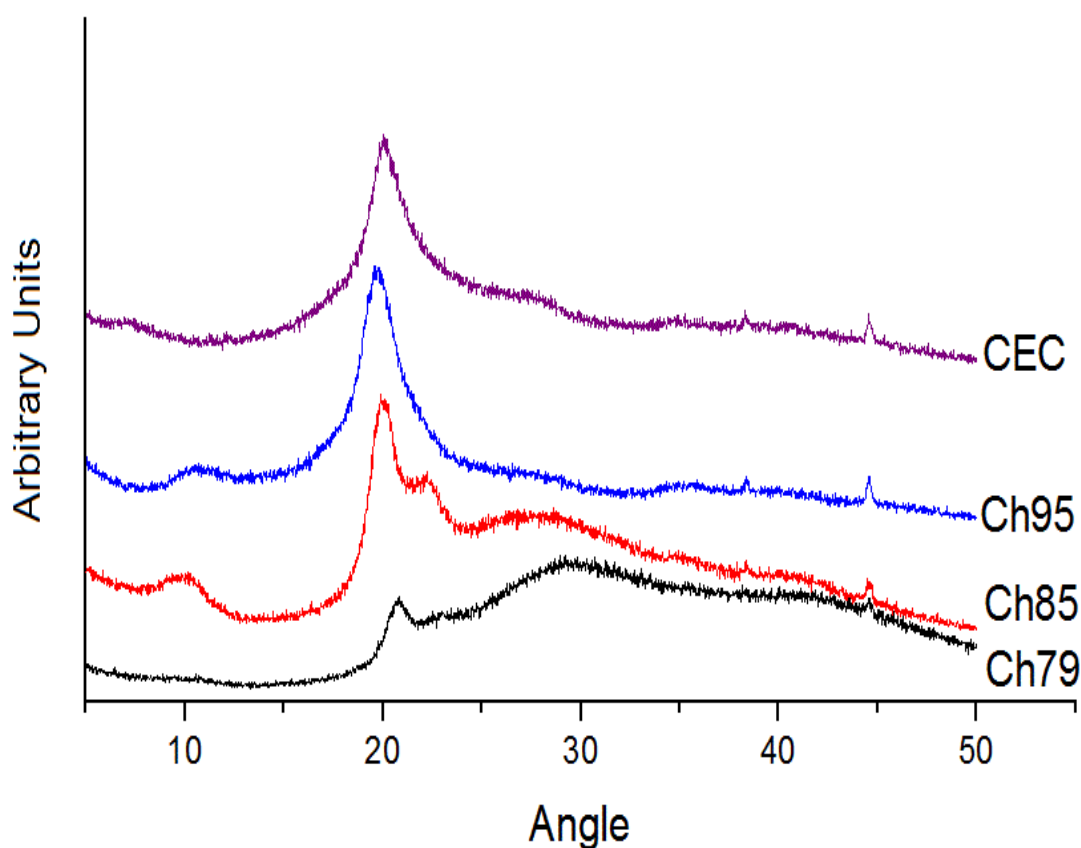


Figure 4.2 XRD spectra of chitosan before sterilization.

SEM: The photomicrographs in Fig. 4.3 are purposely presented at slightly different magnifications, to advantageously demonstrate the structures we discuss; they show the morphological structures of Ch79 (3A), Ch85 (3B) and Ch95 (3C), with orderly, arranged layers forming fibrils. In contradistinction, for CEC (3D), the particles were replaced by a rougher, irregular shape that indicates an alteration of the chitosan structure on carboxyethylation.

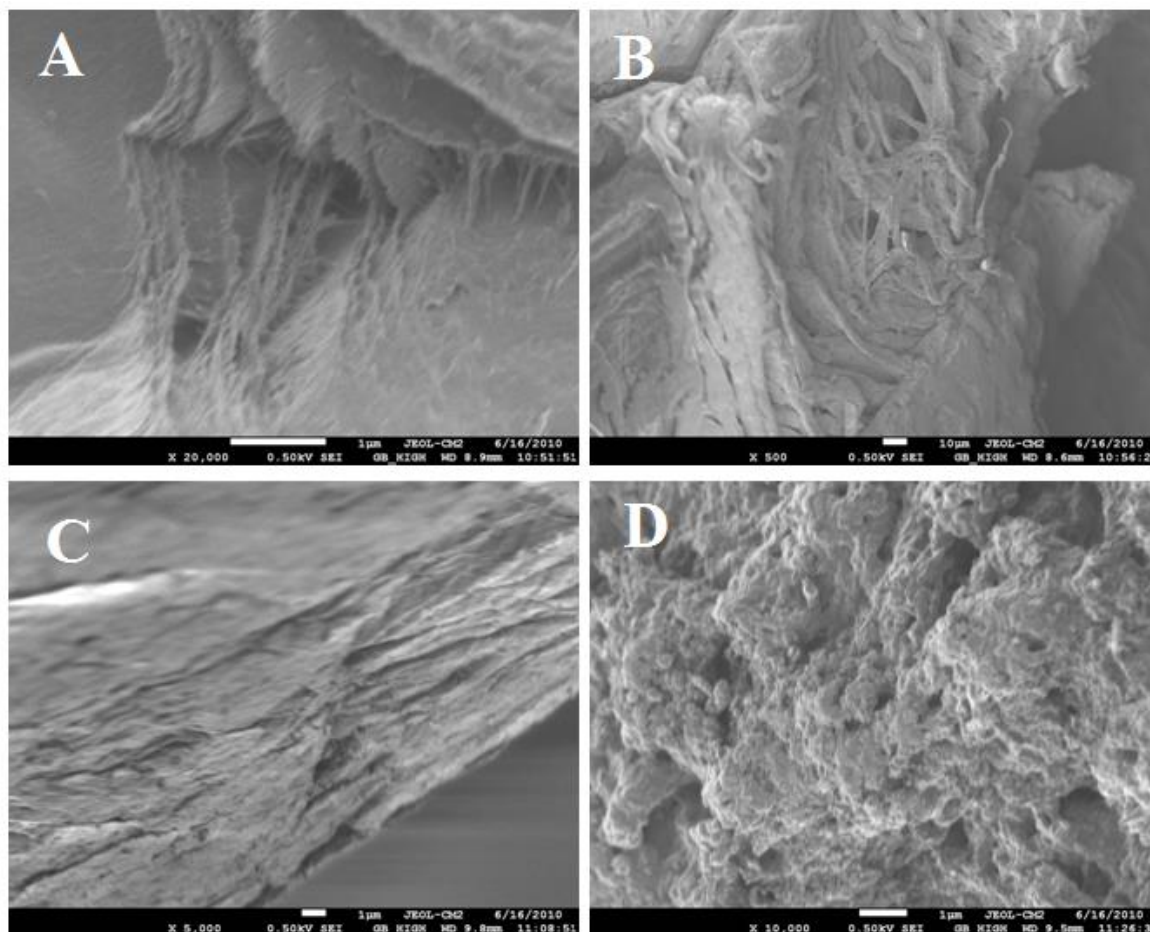


Figure 4.3 SEMs of (A) Ch79, (B) Ch85, (C) Ch95 and (D) CEC

Surface chemical characterization

FTIR: Spectra, found in Fig. 4.4, compare Ch95 and CEC, with those of the sterilized materials in the inset. The principal vibrational band positions and their group attributions [18] are presented in Table 1. Because bands from different chemical structures fall at similar positions, little attributable difference is found among the spectra. For example, all the samples display strong vibrations at 1645 and 1584 cm^{-1} , which have, in the past, been attributed to amide I and II vibrations.

However, since only 20% or less of the nitrogen in our samples occurs as amide, the remaining nitrogen being amine, these attributions are unlikely to be unique. Since amine deformation vibrations also produce strong bands in the $1640\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$ region [19], it is likely that they, too, contribute to these peaks.

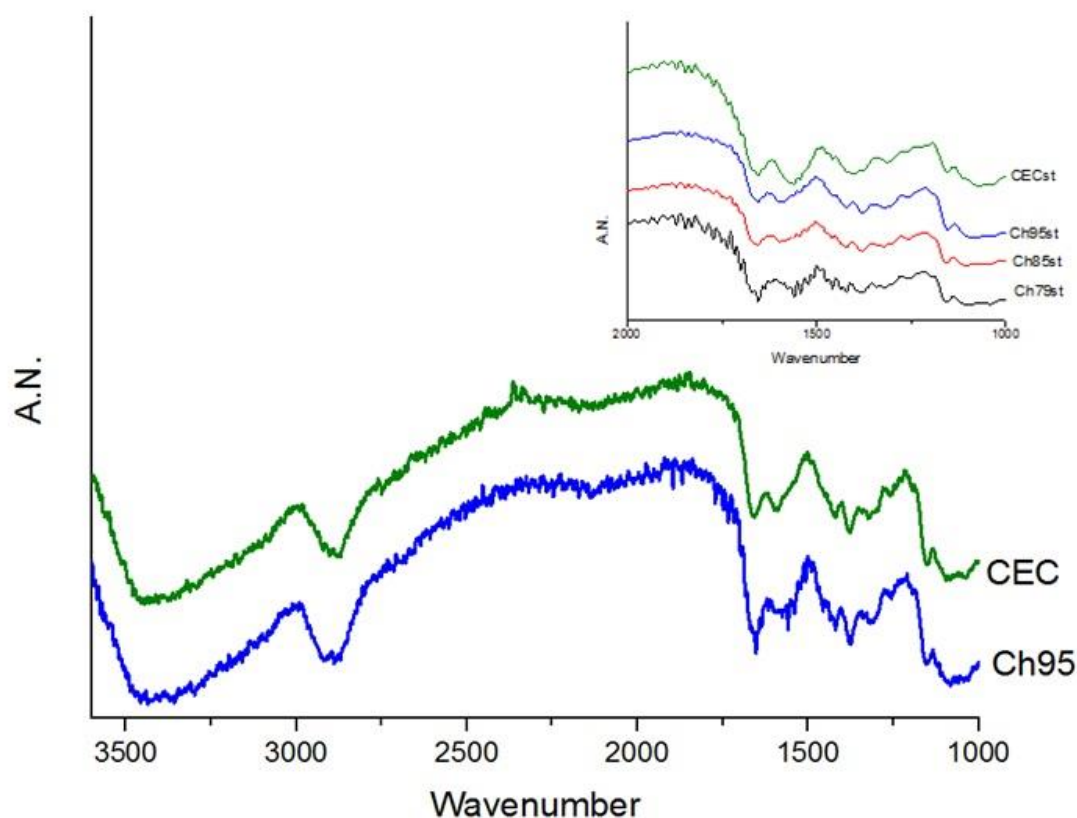


Figure 4.4 FTIR spectra of chitosan samples before and after (st) sterilization with ethylene oxide

The inset to Fig. 4.4 indicates that there are no strong differences among samples before and after EtO sterilization. This is surely because any new vibrational peaks are limited to several nm of sample surface, while FTIR probes 2-3 μm in depth.

XPS: Survey spectra, found in Fig. 4.5, present the elemental compositions, at a probe depth of $\sim 5\text{ nm}$ for C, N, and O (attenuation lengths are $\sim 1.5 \pm 0.2\text{ nm}$ for all these elements, with the

probe depth being $3\times$ the attenuation length); they are given in relative percentages (%), before and after sterilization.

Table 4.1 Vibrational Bands of Chitosan

Band (cm^{-1})	Attribution
3450-3290	O-H stretching
3500-3400	N-H _n stretching
2890-2860	C-H _n stretching
1690-1645	C=O stretching
1600-1580	N-H bending
1560 -1415	symmetric and asymmetric carboxylate group vibrations
1410-1420	CH ₂ bending
1380-1370	CH ₃ symmetric deformation
1160-1150	C-O-C asymmetric stretching, C-N stretching
1020-1030	C-O skeletal stretching
1000-800	C-H deformation

The CEC surfaces were also found to contain trace concentrations of Na and Cl, retained from the fabrication process. The data show an expected decrease in the percentage of C on increasing DD from Ch79 to Ch95, but not for CEC. The percentage of nitrogen atoms expected for CEC should be about the same as in Ch95, but the XPS results show that it suffers a slight, but noticeable, diminution after carboxyethylation: this is because an increase of C and O leads to an apparent relative decrease of N.

Referring to the chemical structure of Ch, in Fig. 4.1, Table 4.2 lists the binding energies of the high resolution XPS peaks for the chemical groups that are expected. Table 4.3 and Fig. 4.6 show that the surfaces of all the samples have chemical compositions that differ from those that are expected. For example, Ch79 has five C1s peaks (recall that C-C and C-N are subsumed into one peak), and the atomic percentages, both before and after contact with EtO, are found to be different than those expected. All samples manifest two or more O1s peaks, at positions that imply the presence of -COOH. CEC has two N1s peaks, quite different from what is expected, since both amine and amide appear at essentially the same position. Unmistakably, at least at the sample surfaces, the structures found do not resemble that in Fig. 4.1.

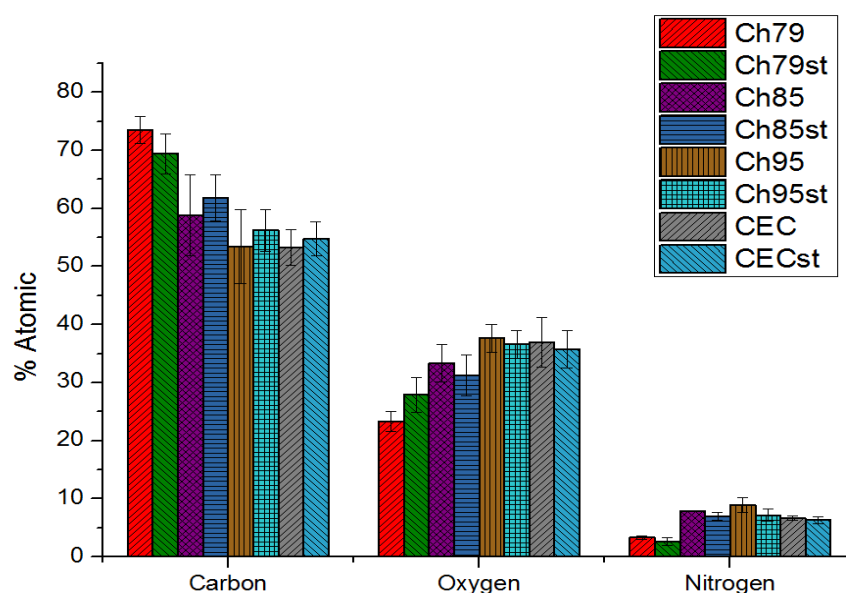


Figure 4.5 XPS-determined relative surface compositions before and after sterilization with ethylene oxide.

Table 4.2 displays the component peak positions expected from high resolution XPS. The C1s spectra of Ch79, Ch85 and Ch95 were predicted to have 3 peaks: the first, at 285.0 eV, is attributed to aliphatic carbon from C-C and C-N groups, and any adventitious carbon; the second peak, at 286.4 eV is attributed to alcohol (C-OH) and ether (C-O-C) groups; the third peak, at 288.0 eV, is attributed to O-C-O and amide carbonyl.

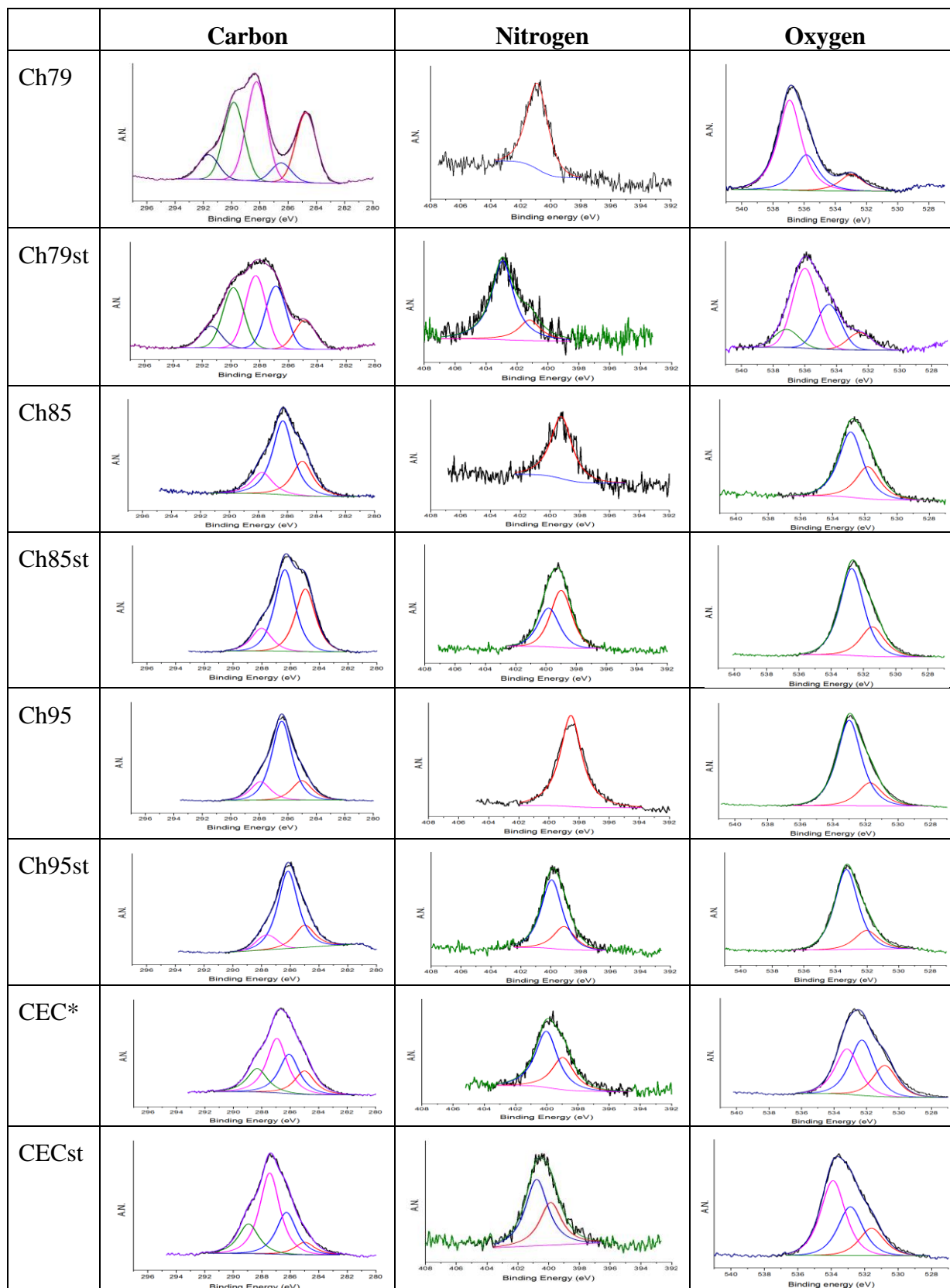


Figure 4.6 XPS spectra before and after sterilization with ethylene oxide

However, Ch79, Ch79st and Ch85st show an unexpected fourth peak, at ~ 289.0 eV, which is attributed to -COOH; CEC and CECst also have these 4 peaks. Additionally, both Ch79 and Ch79st have another, unidentified, peak at > 291 eV, indicating an unidentified C with a high electron density.

Table 4.2 Chitosan XPS peaks expected

	FWHM ^a (eV)	Peak Attribution	B.E (eV)	Peak Ratios ^b			
				79	85	95	CEC
Carbon	0.7	<i>C1s A:</i> CH-CH, C-NH	285.0	2	2	2	2
		<i>C1s B:</i> C-OH, C-O-C	286.4	5	5	5	5
		<i>C1s C:</i> -N-C=O	288.0	0.21	0.15	0.05	0.05
Oxygen	0.8	<i>O1s A:</i> C=O	532.7				1
		<i>O1s B:</i> C-O-C, C-OH	533.3				2
Nitrogen	0.7	<i>N1s:</i> C-NH, N-CO	399.7				

a. Values used in our laboratory peak separations.

b. Values based on the reported amount of amide.

For the O1s spectrum, only one peak, at ~ 533.5 eV, is expected for Ch79, Ch85 and Ch95, because the ether and alcohol group have very similar binding energies. In fact, two or more peaks are found for all the samples, which indicates the presence of other oxidized C species, confirming what was found in the C1s spectrum.

For the N1s spectrum, one peak, at ~ 399.0 eV, is expected for N1s, because N, in both amines and amides, appears at the same binding energy. The Ch79 samples show only one peak, at ~ 401.2 eV, 2 eV higher than for an amine (~ 399 eV), possibly indicating the presence of an ammonium salt (R-NH_3^+) or, more probably, an amine oxidation product (e.g., nitroso); oxidized amine was also found in our recent study of the preparation of magnetite@silica@amine-terminated silane core-shell-shell nanoparticles [20]. CEC, even before sterilization, has two peaks, at ~ 398.9 and 400 eV, the latter suggesting slight amine oxidation (e.g., hydroxylamine or oxime).

While Ch79 and Ch79st both manifest unexpectedly high binding energy C1s and O1s components, this is due to neither referencing nor charging problems. Not only are the N1s components properly energy-corrected, the same spectra were obtained for each replicate. The reason for the presence of these peaks is currently unknown.

To summarize the XPS results before sterilization, all the samples, irrespective of their DD, exhibit additional C1s, O1s and N1s peaks, indicating a modification of the expected surface chemistry. This has been commonly found in the literature. Indeed, without exception, recent publications [21-23], using Ch samples of DD values similar to ours, have deemed it necessary to use 3-4 C1s peaks, 2-3 O1s peaks and 2-3 N1s peaks to fit their XPS results. The extra peaks are variously described as coming from contaminants and amine salts.

The EtO sterilization process is clearly chemical, in nature: EtO is a powerful direct alkylating agent. The addition of alkyl groups to microorganisms, which bind to their hydroxyl, amino and carboxylic acid groups, limits normal cellular metabolism and the ability to reproduce [3]. Our XPS analysis has confirmed that EtO reacts with the sample surfaces, with the appearance of new species. We find that, in addition to the (principal) alkylation reactions, adding hydroxyethyl ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) moieties to hydroxyl, amino and carboxylic acid groups, the particle surface appears to have undergone a (minor) oxidation, particularly noticeable in the N1s spectra: as indicated earlier, the N1s spectra of the Ch and CEC samples all display an additional higher energy peak on EtO sterilization, which can be attributed to amine oxidation; this is confirmed by

their IR spectra [18]. The O1s spectrum of Ch79st manifests a new peak, at 534.8 eV, not present in Ch79, indicating the oxidation of a previously existing group.

To summarize the overall XPS results, the Ch sample surfaces appear to have suffered chemical modifications both on processing from chitin and on EtO sterilization. This has prompted us to avoid further chemical modifications that would result from reprocessing the as-received samples so as to vary size and shape.

TOF-SIMS: Ch95 and CEC were analyzed by TOF-SIMS. Figs. 4.8a and 4.8b show the positive and negative spectra of the unsterilized Ch95, and Figs. 4.8c and 4.8d show those of the sterilized Ch95. Figs. 4.8e and 4.8f show the positive and negative spectra of the unsterilized CEC, and Figs. 8g and 8h show those of the sterilized CEC. Adventitious hydrocarbon fragments were observed in all TOF-SIMS spectra, indicating surface deposition from the atmosphere during manufacture. Na and Cl impurities were observed for both Ch95 and CEC.

Following sterilization, no additional peaks, which might be attributable to sterilization, were observed, but relative intensities of both positive and negative mode peaks were decreased, probably due to EtO-induced surface modifications. The CNO^- fragment (42 D) was clearly observed in the logarithmic intensity spectra (not shown) of all the samples, in support of the XPS data cited above, indicating the presence of amide (N-C=O) and/or amine oxidation (C-N=O). On sterilization, the observed CNO^-/CN^- ratios ($m = 42/26$) increased 20% for Ch95 and 33% for CEC, which can only be due to amine oxidation; for 4 independent determinations, these increases were constant to within 1% for Ch95 and 4% for CEC. This indicates that the increase in the CNO^-/CN^- ratios were due to amine oxidation during sterilization, and also helps to explain why TOF-SIMS found no *new* peaks on sterilization.

Biological Assays

Relative dispersibilities of Ch95 and CEC in the culture medium: In order to compare the dispersion properties of the samples, they were suspended in culture medium, at a concentration of 1 mg/mL [24,25], and analyzed, by light microscopy, at 20 \times magnification. Fig. 9 compares

Ch95 (9A) and CEC (9B): a higher dispersibility was found for CEC, probably due to the presence of polar carboxylic acid groups.

Direct Contact MTT Cell Viability Assay: MTT cell viability was assessed following a 24 h exposure of the cells to chitosan 95 and CEC. While it is true that the number of cells at the time of chitosan exposure is greater than that during seeding, it is the mitochondrial activity of those cells present during exposure that was evaluated. For the MTT measurements, the negative control represents 100 % viability. The cell viability values are given as a percentage of the negative control; it is for this reason that the values are given as percentage of the negative control.

Ch95 showed little or no increase in cell growth viability as a function of concentration (Fig. 10), either before or after sterilization. However, the viability increased subsequent to sterilization. For CEC, the viability decreased with concentration both before and after sterilization, although that following sterilization was greater. For CECst, a maximum in viability occurs at a concentration below 25 µg/ml, the lowest concentration explored in this study.

These direct contact cytotoxicity assays show that all the sterilized samples are biocompatible, the cellular viability being 80% or greater, when compared with the control. Ch95 appears to undergo a slight increase in cell viability with concentration, near 100% cell viability. For Ch95st, there is a marked increase in A549 viability, above 110% of the control; such a response indicates the stimulation of cellular proliferation as a result of sterilization.

By comparison, CEC presents good cell viability, with slight decreases at higher concentrations. As with Ch95, sterilization increases cell viability by about 15-20%, with the maximum cell viability lying at or below the lowest concentration used (25 µg/ml). Clearly, the surface modification incurred by sterilization has a similar effect for both materials.

LDH Assay: LDH, a stable enzyme present in the cytosol, is released upon cell lysis. This assay permits the investigation of compounds that induce alterations in cell integrity. It was performed

to measure the membrane-damaging effects of Ch95 and CEC at different concentrations via the quantity of LDH in the culture media. Based on MTT assay, the different types of chitosan were practically non-toxic after 24 h of incubation. In order to elucidate any membrane-damaging effect caused by these chitosan, their influence on LDH release was investigated using Triton-X as a positive control, as shown in Fig. 4.11. The effect of chitosan particles on the membrane integrity of the A549 cell line was found to be negligible, and independent of both the type of chitosan and the concentration used.

No bacterial contamination was detected, on 24 h of cell incubation, for any of the samples.

4.5 Discussion

Our results indicate three important findings:

Chitosan Surface Structure

The structures at the Ch surfaces are not those expected. Fig. 4.1 represents the conventional structure of Ch. Based on this structure, Ch has six-eight C atoms (depending on the DD), three-four O atoms, and one N atom. As mention earlier (Table 4. 2), high resolution XPS predicts three C components, and one each for O and N. However, all Ch samples show two O components before sterilization. Because ether and alcohol groups have similar binding energies, the second component indicates the presence of another O-containing surface structure.

The atomic ratios of the various peaks, determined by XPS, may be used to confirm correspondence with the structure in Fig. 4.1. For the hypothetical Ch structure, with 100% DD, the ratio expected among the C1s A, B and C peaks is 1:5:0. Nonetheless, Fig. 4.7 shows that the atomic ratios measured do not correspond to these ratios for any of the Ch samples. For example, Ch85 and Ch95 have the correct number of C1s peaks expected, at the correct binding energies. However, their ratios are not the expected 1:5:0.15 (where 0.15 indicates the expected acetyl contribution) for Ch85 and 1:5:0.05 for Ch95; rather, they are the substantially different values of 2.6:5:1.4 and 1.2:5:1.2, respectively. While C1s peak A (285.0) may be influenced by

adventitious carbon from atmosphere contamination, the ratio between C1s peaks B (286.4 eV) and C (288.0 eV) is expected to remain constant. Thus, the percentage of C-O-C and C-OH on the Ch95 surface is expected to be 100× greater than that of N-C=O, rather than the experimentally determined 4×. The reason for these unexpected ratios may be, as suggested earlier, a surface chemically modified by the processing of the original chitin, or it may be that the ideal structure in Fig. 1 does not exist in fact.

EtO Sterilization

On EtO sterilization, the Ch surface was chemically changed, in contradistinction to previous studies [3,26,27] that found that such sterilization does not appear to cause polymer degradation, or changes in physical or mechanical properties. These previous studies did not use surface-sensitive techniques. In contrast, our XPS results show that, on EtO sterilization, all the Ch samples, irrespective of DD, suffered surface chemical alterations (Fig. 4.7). Specifically, the amine groups (the most reactive) underwent oxidation: in particular, Ch85 and Ch95 underwent 40% and 66% oxidation, respectively. Since the changes were not detected by FTIR, with a probe depth of 2-3 μm in the IR frequency range, the phenomenon is certainly restricted to the surface.

As the XPS data on all our unsterilized Ch samples show, the structures expected differ from those found, probably due to the processing that the raw chitin had undergone. Although it is clear that further structural changes have occurred, at all the Ch surfaces, on EtO sterilization, the presently unknown initial structures make it difficult to specify what these changes are.

In contradistinction, the percentage of NH_n in CEC did not change on sterilization. This could be due to several factors: i) the resistance of carboxyethyl amine groups ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) to attack by EtO; ii) the low reactivity of carboxylate groups with EtO; iii) the reduced availability of free amine groups, since those available to reaction ($\sim 45\%$) had already been converted to carboxyethyl amine. As mentioned earlier, the amine group is attractive for biomedical applications; the reduction of the number of such sites on the Ch surface, on EtO sterilization, reduces this attractiveness. Undeniably, because the probe depth for N is ~ 5 nm in depth, our present results cannot indicate whether any of the amino groups detected are exposed for further reaction, or lying below the outer surface but still detectable, as in the case of CEC. However, our

XPS results (Fig. 4.6) clearly show that, in every case, other substantial changes were noted on EtO sterilization.

These findings are supported by the TOF-SIMS results, which show decreases in relative peak intensities on sterilization, as well as increases in the CNO^-/CN^- ratios. Because this technique probes the outer few Ångströms, as opposed to nanometers (XPS) and microns (FTIR), changes seen by TOF-SIMS would be difficult to be observed by the latter two techniques, and should not be overemphasized.

Cytotoxicology

The MTT cytotoxicological results on our Ch samples changed noticeably on sterilization, certainly due to the changes in surface chemistry. Recall that, due to the different dispersibilities of our Ch samples, only Ch95 and CEC could be placed in direct contact with A549 cultures to assess their cytotoxicities. The direct-contact technique is considered to be a more sensitive and reliable method of determining the cytotoxicities of biomaterials, compared to the indirect-contact method [28], capable of assessing the possible toxic effects of Ch surfaces in direct contact with epithelial cells. As noted earlier, we have limited this study to as-received samples, because we wished to separate out any effects due to chemical changes on reprocessing our samples into microparticles; such changes will be discussed in a follow-on paper on pro-drug nanoparticles distributed in chitosan microparticles.

The surface modifications detected by XPS have a real effect on the cytotoxicities of these samples. As seen in Fig. 4.10, the sterilized samples have increased cell viabilities, although their behaviors as a function of concentration are similar to those of the unsterilized samples. This is in agreement with the previous results of Marreco *et al.* [8] on Ch, and recently confirmed [29]. Clearly, the oxygenated chemical groups introduced on sterilization, whose structures need further elucidation, cause the increased viability. Despite this difference between the sterilized and the non-sterilized samples manifested in the MTT assay, the effect of chitosan particles on the membrane integrity of the A549 cell line was found to be negligible, both before and after EtO sterilization, as seen in Fig. 4.11. Additional tests may confirm the long term enhanced proliferation presented by sterilized Ch.

We have not considered here any effects due to particle size or shape, which may play a part in Ch cytotoxicity. Neither have we measured the effect of sample solubility: CEC is known to be more soluble than Ch95, which may influence the direct contact results. These are presently being considered, and will be reported on in a future article. Our results are currently limited to the confirmation that, under the constant sample dimensions considered here, Ch and CEC are biocompatible and non-toxic [8,29-31].

4.6 Conclusions

Four Ch samples were chemically and morphologically characterized, before and after EtO sterilization. While the FTIR and XRD results, which probe the sample volume, are in general agreement with the expected structure of Ch cited in the literature, the XPS analysis, which probes the outer layers, indicates structural alterations detected at the sample surfaces both before and after sterilization. This is supported by TOF-SIMS, which shows an increase in amine oxidation on sterilization.

The retention of bulk characteristics on EtO sterilization, as indicated by XRD and FTIR, shows that the bulk is not affected. However, the surface modifications found have clear biological ramifications. Biocompatibility assays reveal that, for unsterilized material, the effect of concentration on viability is slight, increasing for Ch95 and decreasing for CEC, but is high in both cases. EtO sterilization improves cell viability for both Ch95 and CEC, suggesting that cell proliferation has a preference for oxidized surfaces. The mechanisms involved are presently being explored in a separate study.

4.7 Acknowledgments

Financial support, by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and NMD Inc., is gratefully acknowledged.

4.8 References

- (1) Khor E, Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24: 2339–2349.
- (2) Majeti NV, Ravi K. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000; 46: 1–27
- (3) Thacharodi D, Rao KP. Propranolol hydrochloride release behaviour of crosslinked chitosan membranes. *J Chem. Technol Biotechnol* 1993; 58: 177–181.
- (4) Tokura S, Tamura H. O-Carboxymethyl-chitin concentration in granulocytes during bone repair. *Biomacromol* 2001; 2: 417– 421.
- (5) Hirano S, Tanaka Y, Hasegawa M, Tobetto K, Nishioka A. Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. *Carbohydr Res* 1985; 29 : 205– 215.
- (6) Tran TH, Le Tien C, Gosselin P, Mateescu M-A. Carboxylated chitosan under protonated form for drug controlled release. *Proceedings of the 35th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society*, 12-16 July (2008), New York, USA.
- (7) Mendes GCC, Brandão TRS, Silva CLM. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. *Am J Infect Control* 2007; 35: 574-581.
- (8) Marreco, P. R.; Moreira, P. L.; Genari, S. C.; Moraes, A. M. Effects of Different Sterilization Methods on the Morphology, Mechanical Properties, and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. *J Biomed Mater Res Part B* 2004; 71: 268–277.
- (9) Qi L-F, Xu Z-R, Li Y, Jiang X, Han X-Y. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5136-5141
- (10) Jiang H-L, Lim H-T, Kim Y-K, Arote R, Shin J-Y, Kwon J-T, Kim J-E, Kim J-H, Kim D, Chae C, Nah J-W, Choi Y-J, Cho C-S, Cho M-H. Chitosan-graft-spermine as a gene carrier in vitro and in vivo. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut* 2011; 77: 36–42.
- (11) Hussain SM, Frazier JM. Cellular toxicity of hydrazine in primary rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2002; 69: 424-432 .

- (12) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63
- (13) Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, Casariego A, Teixeira JA, Vicente AA. Influence of electric fields on the structure of chitosan edible coatings. *Food Hydrocoll* 2010; 4: 330–335.
- (14) Minke R, Blackwell J. The structure of α -chitin. *J Mol Biol* 1978; 120: 167-181
- (15) Ziani K, Oses J, Coma V, Mate JJ. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Food Sci Technol* 2008; 41: 2159-2165
- (16) Chatelet C, Damou O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomater* 2001; 22: 261-268
- (17) Varum KM, Myhr MM, Hjerde RJ, Smidsrod O. *In-vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosan in human serum. *Carbohydr Res* 1997; 299: 99-101.
- (18) Bellamy, L.J. *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, 2nd ed., London, Methuen & Co Ltd; 1958, p. 425.
- (19) Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grøndahl L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromol* 2007; 8: 2533-2541.
- (20) França R, Zhang X, Veres T, Yahia I<H, Sacher E. Core-Sheell Nanoparticles as Prodrugs: Possible Cytotoxicological and Biomedical Impacts of Batch-to-Batch Inconsistencies. *J Coll Interface Sci* DOI: 10.1016/j.jcis.2012.08.065.
- (21) Amaral IF, Granja PL, Barbosa MA. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. *J Biomater Sci, Polym Ed* 2005; 16: 1575-1593.
- (22) Janciauskaite U, Rakutyte V, Miskinis J, Maskuska R. Synthesis and properties of chitosan-*N*-dextran graft copolymers. *React Funct Polym* 2007; 68: 787-796.
- (23) Ieva E, Trapani A, Cioffi N, Ditaranto N, Monopoli A, Sabbatini L. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 207-215.
- (24) Wenshui X, Ping L, Jiali Z, Jie C. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, *Food Hydrocoll* 2011; 25: 170-179.

- (25) Aiba S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated Chitosans. *Int J Biol Macromol* 1992; 14: 225-228.
- (26). Angerer J, Bader M, Kramer A. Ambient and biochemical effect monitoring of workers exposed to ethylene oxide. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71: 14-18.
- (27) Baier RE, Meyer AE, Akers CK, Nettielle JR, Maanaghan M, Carter JM. Degradative effects of conventional steam sterilization on biomaterial surfaces. *Biomater* 1982; 3: 241-245.
- (28) Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxico in Vitro* 2005; 19: 145–154.
- (29) Yang Y-M, Zhao Y-H, Liu XH, Ding, F, Gu XS. The effect of different sterilization procedures on chitosan dried Powders. *J Appl Polym Sci* 2007; 104: 1968-1972.
- (30) Mi FL, Tan YC, Liang HF, Sung HW. *In-vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomater* 2002; 23: 181-191.
- (31) San Juan A, Montenbault A, Gillet D, Say JP, Rouif S, Bonet T, Royaud I, David L. Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 2012; 31: 012007.
- .

CHAPITRE 5 NANOSCALE SURFACE CHARACTERIZATION OF BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE, WITH COMPARISONS TO CALCIUM HYDROXYAPATITE AND B-TRICALCIUM PHOSPHATE BIOCERAMICS.

Rodrigo França, DDS, PhD^{a,b}; Taraneh Djavanbakht Samani, PhD^a; Ghislaine Bayade, Eng^a;
L'Hocine Yahia, PhD^a; Edward Sacher, PhD^{a,c}

Journal of Colloids and Interface Science, 420, 182-188, 2014.

^aLaboratoire d'Innovation et d'Analyse de Bioperformance, École Polytechnique de Montréal
C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada

^bDepartment of Restorative Dentistry, Dental Biomaterials Research Laboratory, Faculty of
Dentistry, University of Manitoba, 780 Bannatyne Avenue, Winnipeg, Manitoba R3E 0W2,
Canada

^cRegroupement Québécois de Matériaux de Pointe, Département de Génie Physique, École
Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3A7
Canada

5.1 Abstract

Objectives: It is our aim to understand the mechanisms that make calcium phosphates, such as bioactive calcium hydroxyapatite (HA), and biphasic calcium (BCP) and β -tricalcium (β -TCP) phosphates, desirable for a variety of biological applications, such as the filling of bone defects.

Methods: Here, we have characterized these materials by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared (FTIR), time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS) and laser granulometry.

Results: SEM shows clearly that BCP is a matrix made of macro-organized microstructure, giving insight to the specially chosen composition of the BCP that offers both an adequate

scaffold and good porosity for further bone growth. As revealed by laser granulometry, the particles exhibit a homogeneous size distribution, centered at a value somewhat larger than the expected 500 μm . XPS has revealed the presence of adventitious carbon at all sample surfaces, and has shown that Ca/P and O/Ca ratios in the outer layers of all the samples differ significantly from those expected. A peak-by-peak XPS comparison for all samples has revealed that TCP and BCP are distinct from one another in the relative intensities of their oxygen peaks. The $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ and $\text{CaOH}^+/\text{Ca}^+$ TOF-SIMS intensity ratios were used to distinguish among the samples, and to demonstrate that the OH^- fragment, present in all the samples, is not formed during fragmentation but exists at the sample surface, probably as a contaminant.

Conclusions: This study provides substantial insight into the nanoscale surface properties of BCP, HA and β -TCP. Further research is required to help identify the effect of surfaces of these bioceramics with proteins and several biological fluids.

Clinical Relevance: The biological performance of implanted synthetic graft bone biomaterials is strongly influenced by their nanosurface characteristics, the structures and properties of the outer layer of the biomaterial.

Key words: bioceramic, biphasic calcium phosphate, granulometry, FTIR, hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, porosity, SEM, TOF-SIMS, XPS, XRD.

5.2 Introduction

In the process of bone regeneration by synthetic grafting, the bioceramics most widely used as filling materials are hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), β -tricalcium phosphate (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), and biphasic calcium phosphate (BCP, a mixture of HA and β -TCP),¹⁻³ due to their properties of biocompatibility, biodegradability, bioresorption and osteoconduction.⁴⁻⁶ Each bioceramic, however, differs in its ability to participate with the dynamic physiological

environment and to achieve a degree of chemical equilibrium with the host tissue, without fibrous capsule formation.⁷

HA is the main component of the rigidity of vital tissues, such as bone, and has an ability to drive the further growth of bone on its surface.^{8,9} Thus, the identification and distinction of different phases of bioceramic are crucial for understanding their biological effect.¹⁰⁻¹⁴

The mechanical behaviors of bioactive ceramic are well enough known, and their physicochemical surface properties may now be understood in terms of their structure.¹⁵ Both HA and β -TCP are biocompatible, nontoxic, resorbable, non-inflammatory, cause neither immune nor irritating responses, and have excellent osteoconductive abilities.^{16, 17} They differ in composition and degradation rates: β -TCP shows good ability to biodegrade and to bioresorb up to 10-20 times faster than HA, but in an unpredictable manner, so it may not provide a solid scaffolding for new bone formation.^{18,19}

Biphasic calcium phosphate (BCP), such as Straumann BoneCeramic[®], is composed of a controlled mixture of HA and β -TCP.²⁰ According to the manufacturer's description, it is a fully synthetic bioactive, osteoconductive bone substitute, available in powder form and is already used clinically.²¹ This biphasic calcium phosphate ceramic, composed of 60% HA and 40% TCP, has a chemical composition close to that of bone. It is able to gradually degrade, leaving room for natural bone.²² The results of its implantation indicate good biocompatibility and bioresorbability, when firmly packed into the bone.^{23,24}

Solubility appears to be the characteristic of primary importance in the remineralisation process; results showed that β -TCP has the highest solubility, followed by BCP, then HA.^{17, 25} In addition, the biodegradation rate increases with increasing specific surface area (powders > porous solid > dense solid), and with decreasing crystallinity and grain size;¹ this includes chemical substituents, such as F in HA or Mg in β -TCP.²⁶ In biphasic calcium phosphate, the limiting factor is the HA: β -TCP ratio.²⁷

Bone colonizes bioceramics more easily when their surfaces contain both micro- and macropores.^{3,4,28} Porosity also influences biological material behavior, and is an essential parameter for a satisfactory clinical outcome.^{7,29,30} For good tissue development, the pore size and interconnectivity affect fluids, nutrients and oxygen diffusion and protein adsorption, as well as

cell migration and their attachment, differentiation and proliferation.^{20,31} The presence of macropores (diameter > 100 μm) gives the bioceramic its osteoconductive properties, and promotes cell colonization by providing a scaffold for blood vessel proliferation.^{32,33} The presence of micropores (diameter < 100 μm) increases the exchange surface area required for fluid penetration into tissues, and promotes the adhesion of macromolecules and proteins for selective adsorption; this presents a more suitable geometry for improved cell anchoring and cellular differentiation.^{15,34} It is for this reason that the synthesis process of bioceramics is crucial.³⁵

Carbonate impurities affect the properties of bioceramics. It is important to eliminate such impurities from bioceramics because they introduce critical defects, affecting their mechanical properties during lengthy implantation.³⁶ Because of this, the bioceramic synthesis process is so critical and must be so well controlled.³⁷ Contributions from carbonate impurities can be quantified by surface characterization.¹⁰

In the process of bone regeneration, bioperformance is influenced by the following initial factors: the bioceramic dissolution rate, its chemical composition, its porosity and surface charge.^{1,2,15} Continuous dissolution of the calcium-rich bioceramic may provide a saturation of calcium ions near the surface,^{38,39} which stimulates osteoblast-synthesized extracellular matrix and reduces osteoclastic action, which is inhibited by high local calcium concentration.²⁷

The objective of this article is to identify and distinguish the nanoscale physicochemical features of different phases of three bioceramics, HA, β -TPC and BCP (Straumann BoneCeramic[®], 60% HA-40% β -TCP), to better understanding their biological effects and to clarify the success of their use in implantation.

5.3 Material and Methods:

Samples tested

Experiments were performed on microparticles that provide a greater exchange surface with surrounding fluids and lead to a more rapid bioceramic dissolution and, consequently, to a rapid change in the local stimulated fluid composition. The three synthetic bone substitutes analyzed differed in their Ca:P ratios.

Hydroxyapatite (HA: $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, Ca/P ratio: 1.67) was obtained from Sigma-Aldrich Inc.; β -tricalcium phosphate (β -TCP: $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, Ca/P ratio: 1.5) was obtained from GFS Chemicals, and BCP (Straumann BoneCeramic 500[®], 60% HA-40% β -TCP, Ca/P ratio: 1.61) was furnished by Straumann, Inc.

Protocol

All the samples were initially characterized as dry powders, and are referred to as the initial state. Particle dimensions were determined by laser granulometry. The surface states of the tested materials were then chemically characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), time-of-flight second ion mass spectrometry (TOF-SIMS) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR); their crystallinities and crystal sizes were characterized by X-ray diffraction (XRD), and their morphologies by scanning electron microscopy (SEM).

Sample characterization

a. Particle size by Laser Granulometry:

A Coulter LS Particle Size Analyze was used to determine the particle size distributions: the samples were dispersed in water and sonicated, as instructed by the instrument manual. The instrument provides graphical outputs of the volume, number and surface areal percentages of the particles, over a spherical equivalent diameter size range of 0.4-2000 μm .

b. Surface chemical composition by XPS:

The XPS analyses were performed using a VG ESCALAB 3 MK II; Al K α radiation ($h\nu=1486.6$ eV, with an instrument resolution of 0.85 eV) was used, at a pressure below 1×10^{-9} torr. Powders were pressed into a 1x2 cm sample holder. The elements detected were observed using both survey and high-resolution, spectra, with element-dependent probe depths of ~ 4 -5 nm. The XPS binding energy (BE) values were charge-corrected to that of uncharged adventitious carbon at 285.0 eV. This analysis method gives the energy distribution of electrons emitted as a result of the interaction between the biomaterial and incident X-rays. Their analysis gives qualitative (elements present) and quantitative (the relative concentration of each spectral peak component) information. This information permits us to evaluate the Ca:P and O:Ca ratios at the sample surfaces.

c. Crystal structure and size by XRD:

XRD was used to determine crystallinity of the samples, using a fixed incident beam angle of 5° and a detector angle range of $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$. The X-ray diffractometer (X'Pert MPD) used Cu K α (1.54184 Å) radiation at a voltage of 50 kV, a current of 40 mA, a step size of 0.02° and a scan rate of $1.2^\circ/\text{min}$. The diffraction patterns were processed using the X'Pert High Score software. This method permits distinguishing products with the same gross chemical composition but different crystal structures (e.g., different crystal structures of calcium phosphate). Further, it permits the determination of nanocrystal size through the use of the Scherrer formula on an appropriate diffraction peak.

d. Microstructure and topography by SEM:

A JEOL JSM-7600TFE scanning electron microscope was used to image the surface structure and topography. Accelerating voltages for HA and β -TCP, using the LEI detector, were 1 and 2 kV, respectively; for BCP, using the Compo detector for the 1 micron scale and the LEI detector for the 100 microns scale, the accelerating voltages were 5 kV and 2 KV, respectively.

e. Bulk composition by FTIR:

Infrared spectra were obtained at a resolution of 4 cm^{-1} , using an M-TEC M300 photoacoustic cell mounted on a Digilab FTS700 FTIR spectrometer; 128 scans were co-added to improve S/N. Those results were particularly helpful in the identification of carbonates.

f. Surface chemical composition by TOF-SIMS:

Positive and negative ion spectra obtained with our ION-TOF IV TOF-SIMS, using a 15 kV Bi⁺ primary ion source, were acquired at masses up to 500 D, while maintaining the primary ion dose at less than 10¹² ions/cm² to ensure static conditions. All the positive ion spectra were calibrated to the H⁺, C⁺, CH⁺, CH₂⁺, CH₃⁺, C₂H₅⁺ and C₃H₅⁺ peaks and all the negative ion spectra were calibrated to the C⁻, C₂⁻, CH⁻, C₂H⁻, C₃⁻ and C₃H⁻ peaks before data analysis. Sample spectra were taken over an area 50 µm x 50 µm, with an emission current of 1.0 µA in bunch mode, rastered in random mode, and presented as 128 by 128 pixels.

5.4 Results:

a. Particle size by Laser Granulometry

The particle size distribution depends on the sample synthesis and, as in the case of the BPC, may be intentionally introduced. Figure 5.1 shows the particle size distribution in volume %, which is the size distribution generally given in the literature, and Table 1 displays the statistics. HA was found to have a bimodal distributions, with peaks around 40 and 500 µm, and a mean size of 275 µm. Its high mean : median ratio (2.3) is due to the spread of the dispersion: the closer the mean and median values, the most homogenous the sample distribution, as with BCP.

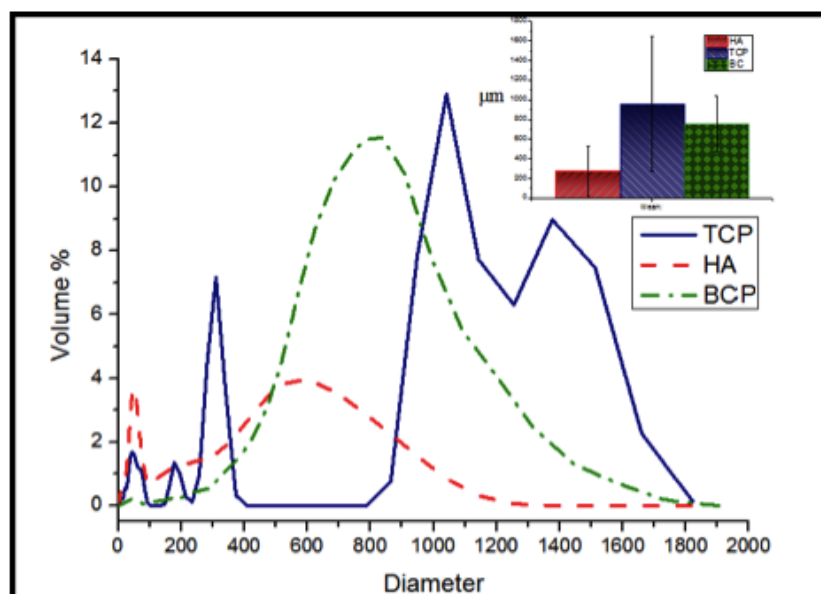


Figure 5.1 Particle sizes measured by laser granulometer

β -TCP appears to be a blend of several particle sizes, as shown by its multimodal distribution. It is composed of two distinct groups of particles: the first, below 400 μm and the second, above 800 μm . The first group contains particles having three well-separated diameters, < 100, \sim 180 and \sim 300 μm . The second group also contains particles having several overlapping diameters, \sim 1000 and \sim 1450 μm . As with HA, β -TCP has a high standard deviation (SD) of the mean, due to the broad range of particle sizes.

BCP has a particle mean diameter around 758 μm and a relatively small SD (287 μm), which indicates a more uniform particle diameter distribution. Both mean and median lie above the average diameter indicated by the manufacturer (\sim 500 μm), although they may have used another technique to obtain that size.

a. Morphology by SEM

Figure 6.2 shows SEM images of samples of HA (a and d), BCP (b and e) and β -TCP (c and f). Images a-c have a scale of 100 μm and indicate the macroscale morphologies of the samples, while images d-f are at a scale of 1 μm and indicate their microscale morphologies. At both of the scales, all surfaces are rough and grainy, in the order β -TCP > HA > BCP.

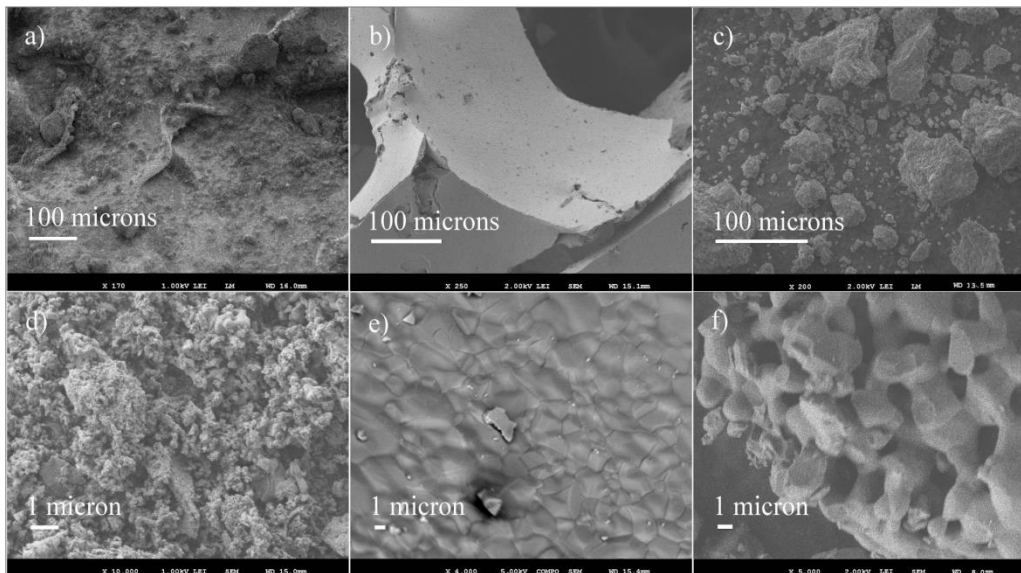


Figure 5.2 SEM photomicrographs of the HA: (a) and (d), BCP: (60HA/40TCP) (b) and (e), and β -TCP: (c) and (f)

These pictures highlight disparate grain and pore sizes, and are clearly due to the preparation methods. Further, the presence of both micro- and macropores in the β -TCP images reflect a wide, connected pore network, having large specific area, which permits increased fluid access and better solubility.

The presence of macroporosity in both β -TCP and BCP is an essential condition for cell anchorage. While BCP appears, in the present preparation, to have no microporosity, the surface appears to be cracked and to contain some holes. These will permit minimal fluid access, as well as progressive biodegradation at grain boundaries.

b. Crystal lattice size by X-ray diffraction (XRD):

XRD spectra of HA and TCP samples match the JCPDS standards of these same materials, available with the instrument software. For the BCP sample, a peak-by-peak comparison, in Figure 5.3, demonstrates that the powder is the expected mixture of HA and β -TCP. The ratio determined from the XRD spectrum is roughly the expected 60% HA and 40% β -TCP.

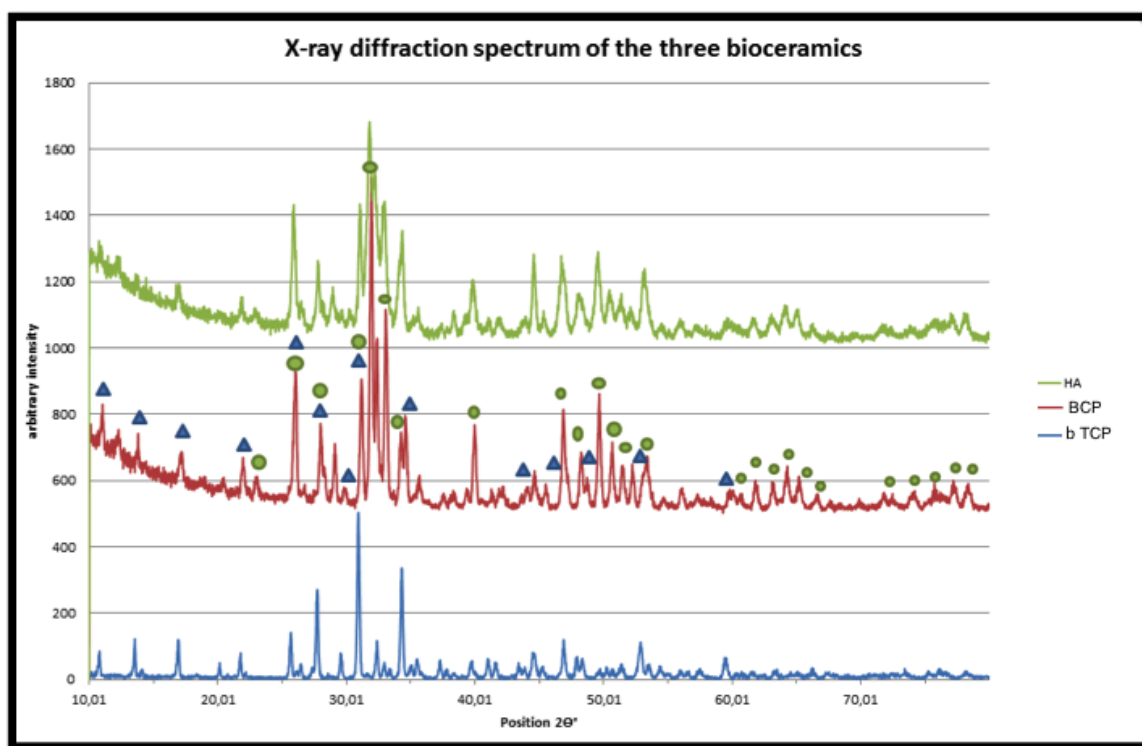


Figure 5.3 X-ray diffraction (XRD) spectra of the three bioceramics

The average dimensions of the nanocrystals were determined by using the Scherrer Equation:

$$t = \frac{k \cdot \lambda}{(H - s) \cdot \cos \theta}$$

where t is the crystal size (its diameter if considered spherical), λ is the wavelength of the incident wave, θ is half the 2θ value, H is the width at half peak height, and k usually takes the value 0.89. Crystal sizes were determined using the XRD peaks at $2\theta = 40^\circ$, and are found in Table 5.1.

Table 5.1 Particle sizes determined by laser granulometry (particle volume) and XRD (crystal size) techniques

		HA	β -TCP	BCP
Granulometry	Mean (μm):	275	1157	758
	SD (μm):	251	685	284
	Median (μm):	119	845	751
	Mean/Median Ratio:	2.32	1.37	1.01
	Mode (μm):	568	1080	825
XRD	Crystal size (nm):	25	67	60
Particle/crystal ratio		11000	17300	12600

Chemical composition by high resolution XPS spectra

XPS survey spectra were used to determine the elemental compositions of the outer layers (~ 4.5 nm) of the samples, and are found in Figure 5.4. High resolution XPS spectra were used to

determine the components present in each spectrum and their relative concentrations, and are found in Figure 5.4. In addition to the O1s and P2p spectra expected, C1s spectra were observed for all samples. Those spectra are due to the adsorption of hydrocarbon impurities, which does not affect the interpretation of our results. Indeed, its presence is advantageous, in that it may be used to calibrate the energy scale by setting its C-C component to 285.0 eV. The C1s spectrum may also contain oxidized C, such as alcohol (~ 286 eV, found in all the samples), carbonyl (~ 287 eV, found in HA) and carbonate (~ 290 eV, found in β -TCP), the latter a common impurity found in calcium phosphates, due to CO₂ absorption from the air. The only other impurity found is Na, detected in the β -TCP sample at a relative concentration of 2%, and is probably due to contamination during the synthesis procedure. The relative contributions of the several carbon impurities can be quantified from the intensities of the C1s peak components.

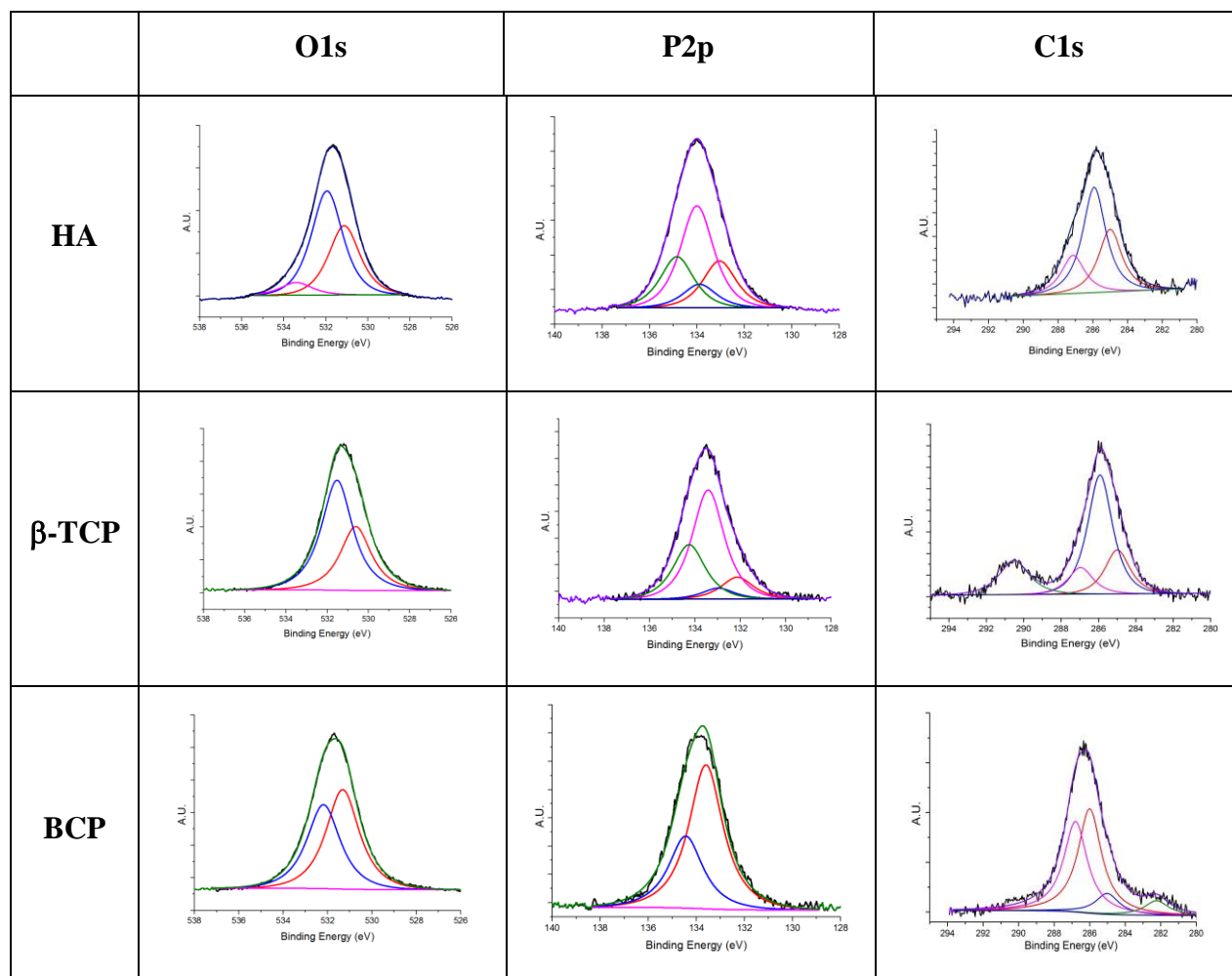


Figure 5.4 XPS high-resolution results for O1s, and P2p spectra of HA, β -TCP and BCP

We have compared the XPS-determined Ca/P and O/Ca ratios, features that facilitate in identifying the Ca-P phases present at the surface of the samples, as well as in determining their molar fractions. The XPS-determined atomic ratios are presented in Table 5.2, along with theoretical values, calculated on the basis of the chemical formulas.

While XPS probes the outer 4-5 nm of surface, which may be contaminated by reaction and/or deposition, and may not be representative of the bulk material, nonetheless, it is this outer surface that first contacts body fluids on implant, and it is indispensable to characterize it and its possible reactions.

Table 5.2 Ca/P and O/Ca atomic ratios of the three bioceramics

	Ca/P	O/Ca	Type of results
HA	0.95	3.97	Experimental
	1.67	2.6	Theoretical
β-TCP	1.39	3.06	Experimental
	1.5	2.67	Theoretical
BCP	1.68	2,69	Experimental
	1.61	2.62	Theoretical

c. Chemical composition by FTIR

Figure 5.5 shows the infrared spectra of the three bioceramics. All samples display two strong vibrational bands, at $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, from PO_4 , and at $550\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, from the overlap of PO_4 and OH libration modes. In addition, HA and BCP have narrow bands at 3570 cm^{-1} from isolated OH stretching, while β -TCP and BCP display band at $1380\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$, which indicate the presence of carbonate groups. As the colored dots above the peaks in BCP indicate, it contains components of both HA and β -TCP.

d. Chemical composition by TOF-SIMS

Our observation of characteristic TOF-SIMS peaks was limited to the mass range of 1-100 amu, for both positive and negative spectra. Figure 5.6 shows positive and negative ion mode TOF-SIMS high mass resolution spectra of HA, β -TCP and BCP. Characteristic positive peaks include Ca^+ , CaO^+ and CaOH^+ ; impurities, such as Na^+ , and adventitious hydrocarbon fragments were also observed. Characteristic negative peaks include O^- , OH^- , P^- , HO_2^- , PO^- , PO_2^- and PO_3^- . The $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ (m/e 79/63) and $\text{CaOH}^+/\text{Ca}^+$ (57/40) intensity ratios have often been used to identify different calcium phosphates.

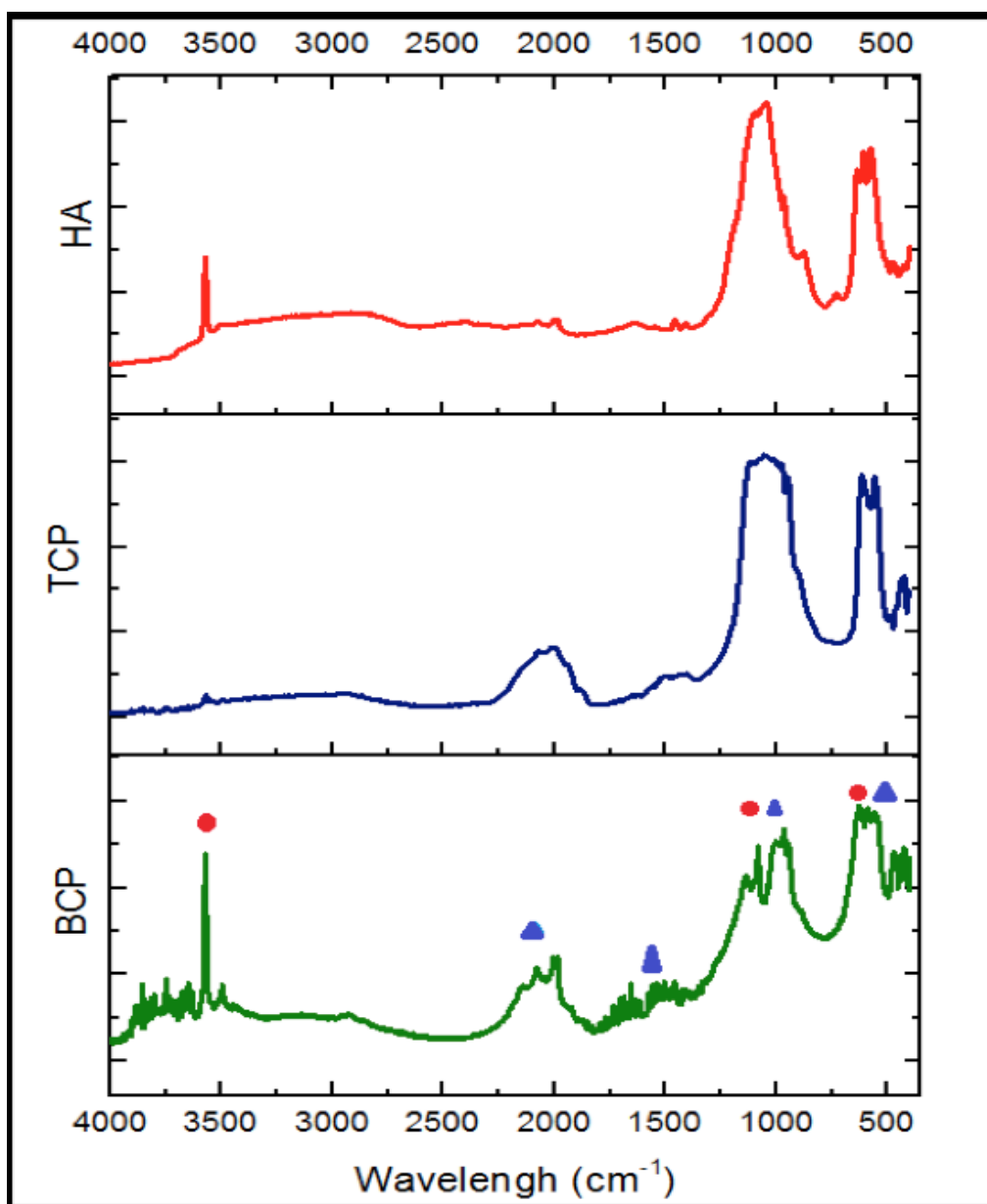
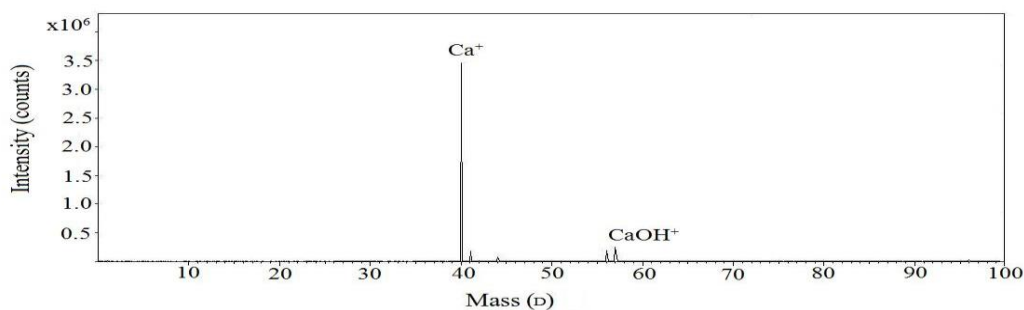


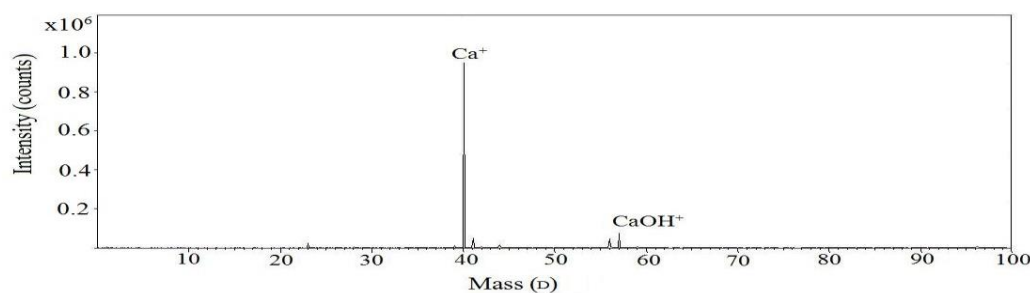
Figure 5.5 Infrared spectra of HA and β -TCP and BCP

The intensity variations of the PO_2^- and PO_3^- peaks appear to be the most distinguishable patterns in the negative ion spectra. These peaks were present in all calcium phosphate samples, and their relative intensities changed among them.^{36,37} We observed such changes in our samples. Using Bi^+ primary ions, the $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ ratios observed were 0.24 ± 0.01 for HA, 0.32 ± 0.01 for β -TCP and 0.35 ± 0.01 for BCP. Ratios for HA, reported by Chusuei et al. and Yan et al., were slightly higher than those for β -TCP, although Lu et al. reported that $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ ratios were slightly higher for β -TCP.^{14,36,37} This variation may well depend on the conditions chosen for the analysis, such as the primary ion, the beam current, etc., which may influence preferential sputtering and/or fragment ionization efficiencies [38]; if so, the $\text{PO}_3^-/\text{PO}_2^-$ ratio may not be useful to distinguish between them.

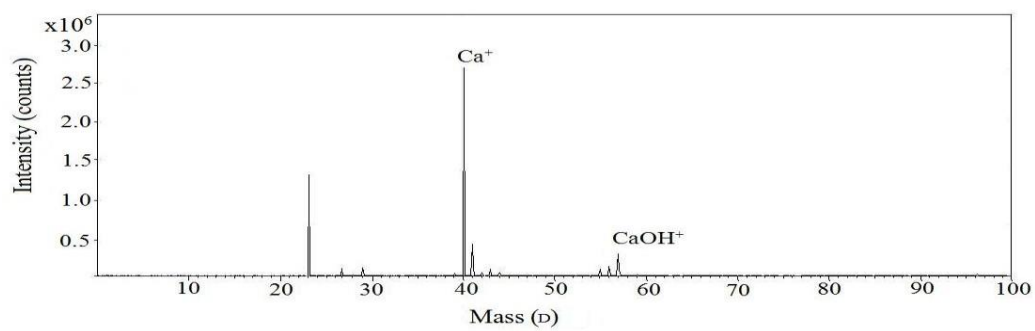
A)



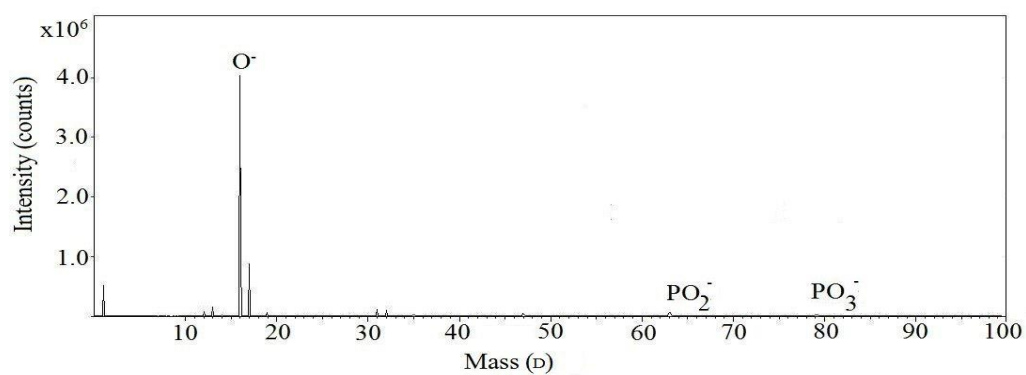
B)



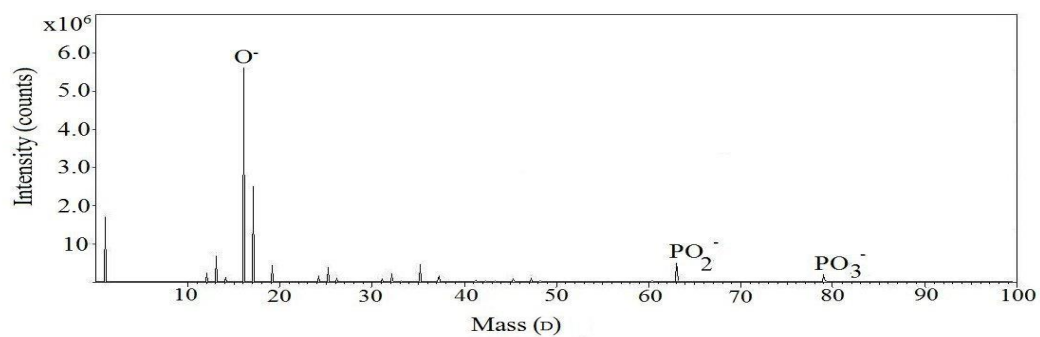
C)



D)



E)



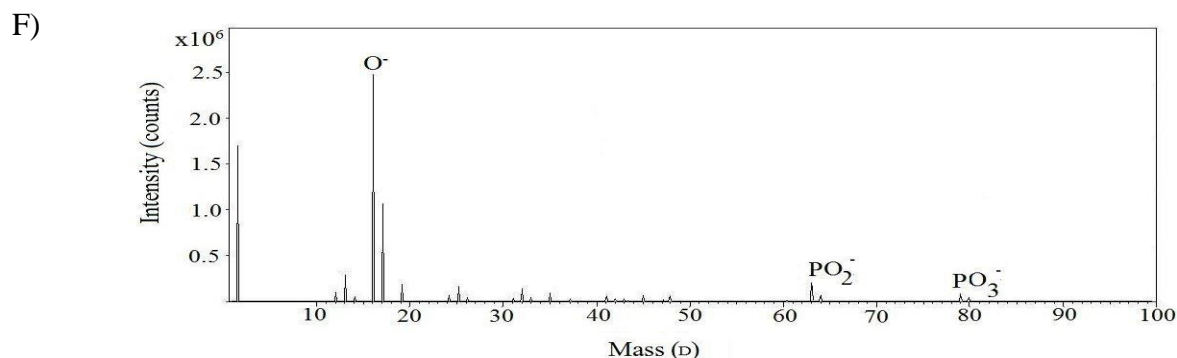


Figure 5.6 Positive TOF-SIMS spectra of (a) HA, (b) β -TCP and (c) BCP; negative TOF-SIMS spectra of (d) HA, (e) β -TCP and (f) BCP.

The $\text{CaOH}^+/\text{Ca}^+$ peak intensity ratios we observed were 0.20 ± 0.01 for HA, 0.17 ± 0.01 for β -TCP and 0.10 ± 0.01 for BCP. Similar results were previously obtained by Yan et al.³⁷ The presence of OH^- peaks in the negative spectra suggests that they do not originate from fragmentation reactions, but are present at the sample surface.

5.4 Discussion

The literature on the effect of chemical characterization is relatively sparse, compared with that on morphological characterization [39]. Previous characterizations, performed by our group, have shown that techniques such as FTIR, XRD and SEM cannot provide all the information need to distinguish the bulk composition from that of the outermost layer [40-42]. The exact composition of the nanoscale surface, and the impurities that cover it, can be probed, using tools such as XPS and TOF-SIMS.

The influence of surface impurities on bioceramic is an important topic. Contributions may often be quantified by surface characterization [10]. It is important to eliminate such impurities from bioceramics because they introduce critical defects, affecting their mechanical properties during lengthy implantation [36]. Because of this, the bioceramic synthesis process is so critical and must be so well controlled [37]. The present study demonstrates that, for all the samples, the Ca/P and O/Ca atomic ratios differ significantly from those expected (Table 6.2). A possible reason

may be the manufacturing process of the powders: ceramics are synthesized at very high temperatures ($> 1000^{\circ}\text{C}$) and then cooled slowly, to achieve the desired phase. Further, there is always a loss of crystalline order at the outer surfaces of all nanoparticles because of a modification of atomic interactions and resultant local arrangements, leading to an amorphous surface phase. In addition, cooling is always more rapid at the surface than in the center of a particle, leaving less time for atoms to adopt a crystalline spatial arrangement. Other preparation conditions, such as the release of volatiles, the pressure and the drying conditions may affect both micro- and macroporosities. Finally, the extent of hydration may also influence the Ca/P ratios. We note that BCP seems to be the least affected by these parameters.

Table 3 contains the XPS analyses of the three samples, with the energy calibrated by setting the major component of the C1s peak to 285.0 eV. As noted earlier, this C1s component comes from adventitious hydrocarbon, and can, itself, be oxidized, depending upon its treatment. We compare our present results with those obtained on chromatography-grade samples of HA and β -TCP [36]. The component values given as O1s A, Ca 2P_{3/2} A and P2p_{3/2} B, Table 3, are in good agreement with those given in reference [36]. O1s C clearly has an organic source, which is the oxidized adventitious hydrocarbon mentioned earlier.

While the source of P2p_{3/2} A cannot yet be determined with confidence, it appears to indicate a species more electronegative (lower binding energy) than phosphate; correspondingly, Ca2p_{3/2} B appears at a higher binding energy (a greater loss of electron density) than that bonded to phosphate, indicating its bonding to a species more electronegative than phosphate. The position of O1s B suggests that the contaminant possesses hydroxyl groups, since many metallic and semi-metallic hydroxides have O1s peaks in that energy region.

In considering the BCP data, the similarities of the XPS spectra for HA, β -TCP and BCP suggest that the O1s A and Ca2p_{3/2} A components of BCP represent that material; as before, the O1s B and Ca2p_{3/2} B components are associated with some other, more electronegative, contaminant. Concerning the single P2p_{3/2} component for BCP, when two components are expected, the peak may be an overlap of the two expected components; that is, recalling our previously mentioned XPS instrument resolution of 0.85 eV, an overlap of P2p_{3/2} A and B for both HA (133.1 and 134.0 eV) and β -TCP (132.1 and 133.4 eV) would result in the quasi-symmetric P2p_{3/2}

component peak found for BCP. The $P2p_{3/2}$ component peak can, in fact be deconvoluted in this manner, although this is not a demonstration of validity.

Finally, in the process of bone regeneration, bioperformance is influenced by the following initial factors: the bioceramic dissolution rate, its chemical composition, its porosity and surface charge [1, 2, 15]. Continuous dissolution of the calcium-rich bioceramic may provide a saturation of calcium ions near the surface [38, 43], which stimulates osteoblast-synthesized extracellular matrix and reduces osteoclastic action, which is inhibited by high local calcium concentration [27].

5.5 Conclusions:

These results provide substantial insight into the nanoscale surface properties of biphasic bioceramic, hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. We measured particle diameters of these bioceramics by granulometry. XRD measurements gave crystal sizes under 70 nm for all the samples. SEM imaging revealed the presence of both micro-and macroporosity in the BCP, conditions necessary for successful incorporation. TOF-SIMS analyses revealed different intensity ratios for the PO_3^-/PO_2^- and $CaOH^+/Ca^+$ fragments, whose values may be due to the experimental conditions employed. The study also confirmed the presence of a surface layer of adventitious hydrocarbon on all the samples, which is always found on high energy surfaces. XPS measurements showed that, for all the samples, the Ca/P and O/Ca atomic ratios differ significantly from the values expected, which is due to the presence of a presently unidentified surface contaminant.

5.6 Acknowledgments

Financial support, by the ITI Foundation for the Promotion of Implantology, is gratefully acknowledged. We thank Straumann, Inc., for furnishing the Straumann BoneCeramic 500[®].

5.7 References:

- [1] Ducheyne P., Qiu Q., Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials*, vol. 20, 2287-2303, 1999
- [2] Kim H.-M., Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy'', *Solid State and Materials Science*, vol. 7, 289–299, 2003
- [3] Rompen E., Domken O., Degidi M., Farias Pontes A. E., Piattelli A., The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review, *Clin. Oral Impl. Res.*, vol. 17, Suppl. 2, 55–67, 2006
- [4] Zhu X.D., Zhang H.J., Fan H.S., Wei Li, Zhang X.D., Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption, *ActaBiomaterialia*, vol. 6, 1536–1541, 2010
- [5] Yoganand C.P., Selvarajan V., Cannillo V., Sola A., Roumeli E., Goudouri O.M., Paraskevopoulos K.M., Rouabhia M., Characterization and in vitro-bioactivity of natural hydroxyapatite based bio-glass–ceramics synthesized by thermal plasma processing, *Ceramics International*, vol. 36, 1757–1766, 2010
- [6] Ni S., Chang J., Chou L. Zhai W., Comparison of Osteoblast-Like Cell Responses to Calcium Silicate and Tricalcium Phosphate Ceramics In Vitro, *J Biomed Mater Res, Part B: Appl Biomater* vol. 80B, 174–183, 2007
- [7] Yuan H., Yang Z., Li Y., Zhang X., De Bruijn J.D., De Groot K., Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials, *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 9, 723-726, 1998

- [8] Bayazit V., Bayazit M., Bayazit E., Evaluation of bioceramic materials in biology and medicine, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, vol. 7, 267-278, 2010
- [9] Marchi J., Greil P., Bressiani J.C., Bressiani A., Muller F., Influence of Synthesis Conditions on the Characteristics of Biphasic Calcium Phosphate Powders, Int. J. Appl. Ceram. Technol., vol. 6, 60–71 2009
- [10] Lu H. B., Campbell C. T., Graham D. J., Ratner B. D., Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphates by XPS and TOF-SIMS, Analytical chemistry, vol. 72, 2886-2894, 2000
- [11] Langford J.I., Wilson A.J.C., Scherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size, J Appl Cryst, vol. 11, 102-113, 1978
- [12] Chusuei C.C., Goodman D.W., Calcium Phosphate Phase Identification Using XPS and Time-of-Flight cluster SIMS, Analytical chemistry, vol. 71, 149-153, 1999
- [13] Tadic D., Epple M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, Biomaterials, vol. 25 , 987–994, 2004
- [14] Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D., Thomas P., Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, Biomaterials, vol. 23 , 1065–1072, 2002
- [15] Zhu X.D., Fan H.S., Xiao Y.M., Li D.X., Zhang H.J., Luxbacher T., Zhang X.D., Effect of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium-phosphate ceramics in vitro and in vivo, Acta Biomaterialia, vol. 5, 1311–1318, 2009

- [16] McLeod K., Kumar S., Dutta N. K., Smart R. St.C., Voelcker N. H., Anderson G. I., X-ray photoelectron spectroscopy study of the growth kinetics of biomimetically grown hydroxyapatite thin-film coatings, *Applied surface science*, vol. 256, 7178-7185, 2010
- [17] Rumpel E., Wolf E., Kauschke E., Bienengräber V., Bayerlein T., Gedrange T., Proff P., The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo, *Folia Morphol.*, vol. 65, 43–48, 2006
- [18] Wiltfang J., Merten H. A., Schlegel K. A., Schultze-Mosgau S., Kloss F. R., Rupprecht S., Kessler P., Degradation Characteristics of α and β Tri-Calcium-Phosphate (TCP) in Minipigs, *J Biomed Mater Res, Appl Biomater* vol. 63, 115–121, 2002
- [19] Yuan H., De Bruijn J. D., Li Y., Feng J., Yang Z., De Groot K., Zhang X., Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α -TCP and β -TCP, *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 12, 7-13, 2001
- [20] Jensen S. S., Yeo A., Dard M., Hunziker E., Schenk R., Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs, *Clin. Oral Impl.*, vol. 18, 752–760, 2007
- [21] Cordaro L., Bosshardt D. D., Palattella P., Rao W., Serino G., Chiapasco M., Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann Bone Ceramic®: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial, *Clin. Oral Impl.*, vol. 19, 796–803, 2008
- [22] Frenken J. W. F. H., Bouwman W. F., Bravenboer N., Zijdeveld S. A., Schulten E. A. J. M., Ten Bruggenkate C. M, The use of Straumann Bone Ceramic® in a maxillary sinus floor elevation procedure: a clinical, radiological, histological and histomorphometric evaluation with a 6-month healing period, *Clin. Oral Impl. Res.*, vol. 21, 201–208, 2010

- [23] Dietze S., Bayerlein T., Proff P., Hoffmann A., Gedrange T., The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic® and NanoBone®, *Folia Morphol.* vol. 65, 63–65, 2006
- [24] Kauschke E., Rumpel E., Fanghänel J., Bayerlein T., Gedrange T., Proff P., The in vitro viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone® and Straumann Bone Ceramic®), *Folia Morphol.* vol. 65, 37–42, 2006
- [25] Moreno E. C., Aoba T., Comparative Solubility Study of Human Dental Enamel, Dentin, and Hydroxyapatite, *Calcified Tissue International*, vol. 49, 6-13, 1991
- [26] Hench L. L., Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, 487-510, 1991
- [27] Yamada S., Heymann D., Bouler J.-M., Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalciumphosphate ratios, *Biomaterials*, vol. 18, 1037-1041, 1997
- [28] Hing K. A Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 2, 184–199, 2005
- [29] G. Daculsi, R. Legeros; Tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic ceramic, in “Bioceramics and their clinical applications, edited by T. Kokobu, CRC Press, Boca Raton, FL., 2008, chapter 17
- [30] Le Huec J.C., Schaefferbeke T., Clement D., Faber J., Le Rebeller A., Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress, *Biomaterials*, vol. 16, 113-118, 1995

- [31] S. Hayakawa, K. Tsuru, A. Osaka The microstructure of bioceramics and its analysis, Bioceramics and their clinical applications, edited by T. Kokobu, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008, chapter 5
- [32] Kasten P., Beyen I., Niemeyer P., Luginbuhl R., Böhner M., Richter W., Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study, *Acta Biomaterialia*, vol. 4, 1904-1915, 2008
- [33] C. Knabe, P. Ducheyne, Cellular response to bioactive ceramic, "Bioceramics and their clinical applications, edited by T. Kokobu, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008, chapter 6
- [34] Cazalbou S., Eichert D., Ranz X., Drouet C., Combes C., Harmand M.F., Rey C., Ion exchanges in apatites for biomedical applications, *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 16, 405– 409, 2005
- [35] Scherrer P, Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen, *Nachr Ges Wiss, Göttingen* Vol. 26, 98-100, 1918
- [36] Legeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., Legeros J.P., Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications, *Journal of materials science: Materials in medicine*, vol. 14, 201-209, 2003
- [37] Cuneit Tas A., Korkusuz F., Timucin M., Akkas N., An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics, *Journal of materials science, materials in medicine*, vol. 8, 91-96, 1997

- [38] McLeod K., Kumar S., Smart R. St.C., Dutta N., Voelcker N. H., Anderson G. I., Sekel R. XPS and bioactivity study of the bisphosphonate pamidronate adsorbed onto plasma sprayed hydroxyapatite coatings, *Applied Surface Science*, vol. 253, 2644-2651, 2006
- [39] Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazson M, Liley M, Ploux L. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. *Acta biomaterialia* 6 (2010) 3824-3846
- [40] França R, Mbeh DA, Samani TD, Le Tien C, Mateescu MA, Yahia L, Sacher E. The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 Jun 7.
- [41] França R , Zhang XF , Veres T , Yahia L , Sacher E. Core-shell nanoparticles as prodrugs: possible cytotoxicological and biomedical impacts of batch-to-batch inconsistencies. *Journal of colloid and interface science*. ; Vol. 389(1):292-7, Jan 2013
- [42] Mbeh DA, França R, Merhi Y, Zhang XF, Veres T, Sacher E, Yahia L. In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: biological and cytotoxicological effects. *J Biomed Mater Res A*.;100(6):1637-46, Jun 2012
- [43]Xin R., Leng Y., Chen J., Zhang Q., A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo, *Biomaterials*, vol. 26, 6477–6486, 2005

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans cette dernière partie, une discussion de l'ensemble de trois articles sera présentée. Le but sera de comprendre l'importance de la caractérisation de surface au niveau nanométrique dans les résultats obtenus et faire une comparaison avec la littérature.

Il semble évident que la caractérisation de surface est une étape fondamentale pour la synthèse et manipulation in-vitro et in-vivo des biomatériaux. Plusieurs auteurs ont déjà souligné qu'il faut connaître la composition physicochimique de la surface pour bien comprendre l'interaction entre le biomatériau et le tissu hôte. (Poolle, C. & Ovens, F 2003; Rege, K. & Medintz, I., 2009; Bandyopadhyay, A. & Bose, S. 2013). Cependant, il paraît que présentement, la majorité des chercheurs n'ont pas l'habitude d'entreprendre une caractérisation au niveau nanométrique avant de faire de test in-vitro or in-vivo. En effet, une recherche effectuée sur PubMed à l'automne 2014 a donné les résultats suivants : en utilisant les mots : *nanoparticles for drug delivery*, nous avons trouvé 19308 articles; en utilisant les mots *characterization of nanoparticles for drug delivery*, nous avons trouvés 1760 articles (9.11% du total); pour fin, nous avons utilisé les mots : *physicochemical characterization for drug delivery* et nous avons trouvé seulement 244 articles (1.2% du total).

Ce manque d'information par rapport à la caractérisation physicochimique contraste avec plusieurs articles que relatent les résultats divergents or l'effet inattendu des biomatériaux des tests *in vitro* ou *in vivo*. À cet égard, Xiaoke et al (2009), ont montré que beaucoup de travaux de recherche existants sur nano toxicité sont basés sur une évaluation empirique de la toxicité des nanoparticules, et que importance moindre a été donné à la relation entre les propriétés des nanoparticules (par exemple, la composition chimique exacte, la forme, la taille, la dispersion de taille, agrégation) et la toxicité. Les auteurs ont conclu que cette approche empirique donne des informations très limitées, et ne doit pas être considéré comme suffisant pour établir des prévisions de la toxicité des matériaux de nanoparticules apparemment semblables.

Dans les trois articles qui composent cette thèse nous avons analysé des biomatériaux métalliques, polymériques et céramiques, dont la taille était nanométrique or micrométrique. Pour chacun on a déjà discuté l'importance de la reproductibilité de résultat de la caractérisation pour

assurer la sécurité d'un biomatériau utilisé dans une finalité précise. Maintenant nous allons discuter l'importance de la composition chimique de la surface, la morphologie et la cristallinité de surface.

Pour l'analyse chimique de la surface, nous avons utilisés : FTIR, XPS et TOF-SIMS. La spectroscopie FTIR est une technique relativement peu coûteuse, rapide et largement utilisée pour la caractérisation des biomatériaux. Néanmoins, FTIR a une profondeur d'analyse de l'ordre de 2-3 μm . Pour savoir la composition chimique de la surface au niveau nanométrique, XPS a été utilisé, vu que seulement les électrons provenant des premières couches atomiques peuvent être détectés par cette technique (Bandyopadhyay, A. & Bose, S. 2013). Dans le premier article, FTIR a été très importante pour démontrer la réaction de Fe_3O_4 avec TEOS (Figure 3.4). Cependant, FTIR n'a pas été capable de détecter les variations lot à lot qui a été très bien documenté par XPS. Par ailleurs, dans le deuxième article, l'effet d'oxyde d'éthylène sur les échantillons de chitosane n'a pas été aperçu par le spectre FTIR, car la profondeur sondée par FTIR est mille fois plus profonde que la profondeur sondée par XPS. Les différences seulement sont exposées après la déconvolution des pics à haute résolution de XPS, aussi les phénomènes comme l'oxydation des amines de tous les types de chitosanes et les pics O 1s (par exemple Ch79st) Figure 4.6. Dans le troisième article, le FTIR a été très utile pour déterminer la composition hybride du BCP comme montre la Figure 5.5. Et comme XPS est capable de sonder une profondeur de 4-5 nm de la surface de biocéramiques, nous avons constaté que la composition à la surface (Tableau 5.2) est différent de celle qui a été présenté dans la littérature (LeGeros & LeGeros, 2008; Rey et al. 2008).

Il est aussi important de faire le contraste entre ces deux techniques, car XPS est une technique qualitative et quantitative tandis que FTIR est seulement qualitative. Par conséquent, les analyses utilisant XPS sont plus appropriées pour fournir la composition chimique au niveau nanométrique. Mais, même si le XPS peut offrir un spectre avec un survol des pourcentages atomiques de chaque composant et un spectre à haute résolution pour connaître les liaisons chimiques de ces composantes, cette technique n'est pas utilisée fréquemment dans la littérature.

Il faut noter que XPS n'est pas une technique parfaite. Dans une excellente revue de la littérature, Castner & Ratner (2002) ont mentionné que la frontière pour l'utilisation du XPS dans le domaine biomédicale est d'améliorer sa résolution spatiale. Cependant, un défi majeur sera

d'améliorer la résolution spatiale sans introduire la dégradation de l'échantillon. Il faut remarquer que pour une analyse à grande surface de matériaux organiques et biologiques avec XPS monochromatique, la dégradation de l'échantillon n'est généralement pas une préoccupation. Cependant, comme le faisceau de rayons X se concentre dans les zones de plus en plus petites, la luminosité de rayons X (photons par unité de surface) pourra augmenter de même que le potentiel de dégradation de l'échantillon. Ainsi, lors du passage de faible résolution spatiale de l'analyse à haute résolution de l'analyse spatiale, XPS peut passer d'une technique "non-destructive" à une "destructive". Selon ces auteurs, pour augmenter la résolution spatiale de XPS, tout en maintenant des conditions d'analyse non destructives, il faudra des progrès dans les méthodes d'acquisition d'images avec des doses plus faibles de rayons X (tramage du faisceau de rayons X, l'amélioration de la sensibilité de l'analyseur et le détecteur, etc.).

TOF-SIMS est une autre technique d'analyse de surface qui a été utilisée dans les articles 2 et 3. TOF-SIMS génère un spectre de masse de la couche extérieure (1-2 nm) de l'échantillon, en fournissant des informations détaillées sur la structure moléculaire des matériaux synthétique, organiques et biologiques (Benninghoven, A. 1994). TOF-SIMS a la capacité de produire l'information moléculaire détaillée de la structure à des résolutions spatiales élevées, ce qui en fait une technique précieuse pour l'analyse de surface biomédicale (Willse & Tyler, 1998). Cependant, de nombreux défis doivent être abordés avant de pouvoir exploiter pleinement les capacités de l'imagerie TOF-SIMS peut être réalisée. Ces défis comprennent: (1) l'analyse de grands ensembles de données, (2) des images avec faible rapport signal sur bruit, (3) l'identification des espèces chimiques nécessite généralement l'utilisation de plusieurs pics et (4) en distinguant la topographie et l'effet de la chimie.

Lorsque les surfaces de chitosane ont été analysées avec TOF-SIMS (article 2), des fragments d'hydrocarbures ont été observés dans tous les spectres, indiquant dépôt de surface du carbone de l'atmosphère lors de la fabrication. Des impuretés Na et Cl ont aussi été observés pour les deux types de chitosane Ch95 et CEC. À la suite de la stérilisation, pas de pics supplémentaires, qui pourraient être attribuables à une stérilisation, ont été observés, mais les intensités relatives des deux pics de mode positif et négatif ont diminué, probablement en raison de modifications de surface induites par l'oxyde d'éthylène. Le fragment CNO⁻ (42 D) a été clairement observée dans les spectres d'intensité logarithmique de tous les échantillons, à l'appui des données de XPS, indiquant la présence d'amide (NC=O) et / ou l'oxydation de l'amine (CN=O). À la stérilisation,

les rapports CNO- / CN- observées ($m = 42/26$) ont augmenté 20% pour Ch95 et 33% de la CEC, qui peut être due à l'oxydation amine; pour 4 déterminations indépendantes, ces augmentations ont été constante à 1% pour Ch95 et 4% de la CEC. Cela indique que l'augmentation des rapports CNO- / CN- était dû à l'oxydation amine lors de la stérilisation, et contribue à expliquer pourquoi on n'a pas trouvé de nouveaux pics au TOF-SIMS après la stérilisation aussi.

Le TOF-SIMS a été utilisé pour caractériser la surface des biocéramiques dans l'article 3. Nous avons observé des intensités relatives modifiées des PO_2^- et PO_3^- pics dans le spectre d'ions négatifs dans les échantillons. En utilisant des ions primaires Bis^+ , les rapports $\text{PO}_2^- / \text{PO}_3^-$ observées étaient de $0,24 \pm 0,01$ pour HA, $0,32 \pm 0,01$ pour β -TCP et $0,35 \pm 0,01$ pour BCP. Les rapports pour HA, rapportés par Chusuei et al. (1999) et Yuan et al. (2001), ont été légèrement supérieurs à ceux de β -TCP, bien que Lu et al. (2000) aient rapporté que les rapports $\text{PO}_2^- / \text{PO}_3^-$ étaient légèrement plus élevés pour β -TCP. Cette variation peut être la cause des conditions choisies pour l'analyse, tels que l'ion primaire, le courant du faisceau, etc., qui peuvent influencer la pulvérisation et / ou les fragments à efficacité préférentielle d'ionisation; le cas échéant, le rapport $\text{PO}_2^- / \text{PO}_3^-$ peut ne pas être utile de distinguer entre eux.

La caractérisation morphologique des biomatériaux étudiés dans cette thèse a été faite selon trois paramètres : la taille, la forme et l'aire de surface des particules. Dans les cas des nanoparticules, elles ont été analysées en utilisant la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie électronique à balayage (SEM). Les résultats (Fig. 3.2) ont démontré que les nanoparticules ont la taille moyenne environ de 60 nm de diamètre et qui ont la forme sphéroïdale et sont composées d'un cœur métallique et un revêtement céramique. Certains effets dynamiques importants sont fortement influencés par la taille des particules. Tout d'abord, en tant que les particules augmentent en taille, leurs forces van der Waals ou les énergies de liaison vont augmenter linéairement (Min, Y. et al, 2008). Cette charge à la surface influence la tendance à l'agrégation et l'agglomération des nanoparticules, comme on peut le voir sur la figure 3.2.

Le SEM a été utilisé pour la caractérisation morphologique des chitosanes et des biocéramiques aussi. Dans les deux cas, nous avons constaté des différences majeures entre les échantillons par rapport la taille et la forme des particules de la poudre. Ces différences sont représentées par les figures 4.3 (chitosanes) et 5.2 (biocéramiques).

Pour pouvoir connaître la distribution de la taille de biocéramiques nous avons utilisé la granulométrie à laser. La distribution de la taille des particules dépend de la synthèse de l'échantillon et peut être introduite intentionnellement. La figure 5.1 montre la distribution de taille de particules de biocéramiques en % de volume, qui est la distribution de taille généralement donnée dans la littérature, et le tableau 5.1 montre les statistiques. β -TCP et HA ont une distribution bimodale, HA avec des pics d'environ 40 et 500 μm , β -TCP deux groupes distincts de particules: la première, au-dessous de 400 μm et le deuxième, au-dessus de 800 μm . BCP avait la distribution la plus homogène l'échantillon. BCP a un diamètre moyen des particules autour de 758 μm et un écart type relativement petite (287 μm), ce qui indique une distribution plus uniforme du diamètre des particules.

La connaissance de la structure cristalline des biomatériaux est une étape fondamentale pour comprendre leurs propriétés. La cristallinité des échantillons a été analysée par la méthode de diffraction des rayons X (XRD). XRD fournit une mine d'informations: à partir de l'identification des phases à la taille des cristaux, de « *lattice strain* » à l'orientation cristallographique des nanoparticules. XRD a l'avantage d'être une technique non destructive (Bandyopadhyay, A. & Bose, S. 2013). Nous avons déterminé la taille des nanoparticules d'oxyde de fer avec XRD et les résultats sont présentés à la figure 1 et le tableau 1 de l'annexe 1. Dans cet article, les données dimensionnelles et de cristallinité ont démontré les nanoparticules avec des dimensions de cristal de plusieurs dizaines de nanomètres et les présences d'impuretés inattendues.

Pour les chitosanes, le XRD a confirmé qu'il y avait différentes formes cristallines. L'alfa-chitine, à partir de laquelle les échantillons sont dérivés, a une cellule orthorhombique bien compacté, formé par des chaînes parallèles et antiparallèles alternées. Les diagrammes de diffraction des rayons X de tous les échantillons, avant stérilisation (Fig. 4.2), présentent un pic à $2\theta = 20^\circ$, et le degré de cristallinité augmente avec la valeur DD. Cette différence de cristallinité peut refléter le fait que les chitosanes dont le degré de désacétylation est supérieur sont plus compacts, avec un plus grand nombre de groupes amines facilitant la liaison hydrogène (Ziani, K. et al. 2008) et la formation de cristaux. Les résultats de diffraction des rayons X n'ont pas changé sur la stérilisation. En effet l'oxyde d'éthylène ne concerne que la surface extérieure de l'échantillon.

Pour les biocéramiques, utilisant XRD nous avons fait une comparaison pic-à-pic, (figure 5.3), qui a démontré que la poudre de BCP est comme prévue, un mélange de HA et de β -TCP. Le

rapport déterminé à partir du spectre de diffraction des rayons X est prévu à peu près 60% de HA et 40% de β -TCP. De plus, en utilisant l'équation de Scherrer, la taille du cristal a été établie: HA 25 nm, β -TCP 67 nm et BCP 60 nm. Ainsi, diffraction des rayons X est une technique très simple qui permet de mesurer des millions de cristaux dans un temps court, à caractériser avec précision la distribution de la taille des nanoparticules par rapport aux images des techniques couramment utilisées, telles que AFM, SEM, TEM, etc., qui sont très laborieux et coûteux.

Une dernière considération doit être faite par rapport à l'interaction entre la surface des biomatériaux étudiés et le milieu biologique. Le but ultime pour le modèle des sciences de la surface serait de fournir une compréhension de la façon dont la chimie de surface et la structure des matériaux peuvent être utilisés pour contrôler la réactivité biologique d'une cellule interagissant avec cette surface. La littérature révèle de nombreuses tentatives de corréler la propriété de biocompatibilité des biomatériaux avec les propriétés de surface. Pourtant, à ce jour, il n'y a pas de règles claires qui peuvent être utilisées pour baliser et pour concevoir un matériau pour avoir de la biocompatibilité (Castner & Ratner, 2002).

Nous avons étudié l'effet de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules : $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$, sur la biocompatibilité, et les résultats sont dans l'article qui est présenté à l'annexe 2. La capacité de la ligne A de la cellule 549 pour maintenir morphologie, après les 24 et 72 h d'incubation avec les nanoparticules fonctionnalisés, a été déterminée par la microscopie optique, et les résultats se trouvent sur la figure 5 de l'annexe 2. Les microphotographies ont montré que la morphologie cellulaire a été altérée, en comparaison avec les contrôles. La culture des cellules avec les nanoparticules a produit une différence significative de l'extension latérale des cellules, par rapport à celle de la population de cellules contrôle [Fig. 5 (a-d)]. Après 72 h, la morphologie des cellules n'a pas amélioré avec le temps; les cellules A 549 ont diminué et ont pris une forme irrégulière [Fig. 5 (d)]. Nous avons aussi trouvé que pour les trois types de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$, la quantité de LDH a commencé à augmenter entre 50 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, ce qui correspond à une décroissance de la viabilité, (Fig. 7 annexe 2). Même si, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ avaient les mêmes fonctionnalités de surface et les concentrations d'amines après suspension (l'effet couronne) dans un milieu de culture (voir le tableau II, colonne CM, annexe 2) les résultats entre 50 et 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ étaient différents. Nous croyons que la différence de taux a été causée par la différence de taille entre les nanoparticules.

L'effet de la stérilisation par l'oxyde d'éthylène sur les chitosanes Ch95 et CEC a été évalué utilisant le test MTT. Les résultats MTT sur nos échantillons ont changé sensiblement après la stérilisation, certainement en raison des changements de la chimie de surface. Les modifications de surface détectées par XPS ont eu un effet réel sur les résultats de cytotoxicité de ces échantillons. De toute évidence, les groupes chimiques oxygénés introduits par la stérilisation, dont les structures ont besoin de plus amples éclaircissements, ont provoqué une viabilité accrue. En dépit de cette différence entre les échantillons stérilisés et les non stérilisés, observée par le test MTT, l'effet des particules de chitosane sur l'intégrité de la membrane de la lignée de cellules A549 a été trouvé comme négligeable, à la fois avant et après stérilisation par l'oxyde d'éthylène, comme on le voit sur la Fig. 4.11.

CONCLUSION

La performance biologique d'un biomatériau pour la délivrance de médicaments est beaucoup influencée par les propriétés de surface. Les travaux de cette thèse ont été fondamentaux pour le développement de stratégie dans un projet pour délivrer NO à la paroi pulmonaire et aussi dans un projet pour promouvoir la formation osseuse.

L'importance d'une caractérisation physicochimique au niveau nanométrique des biomatériaux a été démontrée. C'est devenu clair que différemment de XPS, les techniques qualitatives comme FTIR, SEM, etc., ne sont pas capables de décrire de façon idéale la situation de la nano-surface de biomatériaux.

En regardant la bibliographie qui compose cette thèse, et les trois articles qui en font partie, nous pouvons constater que, en général, les travaux de recherche dans le domaine de la biocompatibilité qui omettent de faire une analyse physicochimique au niveau nanométrique de surface peuvent induire à des erreurs quant à d'analyse de résultats.

Comme futurs travaux de recherche qui sont proposés à partir de cette thèse, nous pouvons citer :

- L'analyse d'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules.
- La biocompatibilité des sphères de chitosane avec les nanoparticules.
- L'effet de la composition de surface dans la dégradation des sphères de chitosane dans un environnement biologique simulé.
- L'analyse d'adsorption de protéines à la surface des biocéramiques

En conclusion, nous espérons que les progrès dans le domaine d'analyses de surface au niveau nanométrique vont promouvoir une connaissance détaillée de savoir comment les propriétés de surface peuvent contrôler les réactions du milieu biologique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alborno, C.; Jacobos, S. E. J. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid. *Magn. Magn. Mater.* 2006, 305(1) 12-15.
- Alcala, M. D.; Real, C. Synthesis based on the wet impregnation method and characterization of iron and iron oxide-silica nanocomposites. *Solid State Ionics* 2006, 177(10) 955-960.
- Alvarez, G. S.; Muhammed, M.; Zagorodni, A. A. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 4625.
- Barnakov, Y. A.; Yu, M. H.; Rosenzweig, Z. Manipulation of the magnetic properties of magnetite-silica nanocomposite materials by controlled Stober synthesis. *Langmuir* 2005, 21, 7524.
- Basak, S.; Chen, D.-R.; Biswas, P. Electrospray of ionic precursor solutions to synthesize iron oxide nanoparticles: Modified scaling law *Chem. Eng. Sci.* 2007, 62, 1263
- Belessi, V.; Zboril R; Tucek, J.; Mashlan, M., Tzitzios, V.; Petridis, D. Ferrofluids from magnetic-chitosan hybrids. (2008) *chem. Mater.*, 20, 3298–3305
- Benninghoven, A Surface analysis by secondary ion mass spectrometry (SIMS), *Surf. Sci.* 299/300 (1994) 246–260
- Bin Zhang & Bing Yan (2009) Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.* Feb 2010; 396(3): 973
- Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J.O., (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 56(11): 1649.
- Bruce, I. J.; Taylor, J.; Todd, M.; Davies, M. J.; Borioni, E.; Sangregorio, C.; Sen, T. J. Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites *Magn. Magn. Mater.* 2004, 284, 145.
- Brydson, J. A. (1999). *Plastics Materials* (7^e éd.). Oxford: Butterworth-Heinemann.

- Burlingame, A. L.; Gaskell s. J.; Boyd R. K. (1996), Mass spectrometry. *Anal. Chem* 68 (12),599r-651r.
- Cedervall E., Lynch, J.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Kenneth A. Dawson, Linse S. (2007) Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles *Pnas* february 13, 2007, vol. 104, no. 7
- Chin, A. B.; Yaacob, I. I. J. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart’s procedure. *Mater. Process. Technol.* 2007, 191, 235–237.
- Del Campo, A.; Sen, T.; Lellouche, J.-P.; Bruce, I. J. Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences.*J. Magn. Mater.* 2005, 293, 33.
- Deng, Y.-H.; Wang, C.-C.; Hu, J.-H.; Yang, W.-L.; Fu, S.-K. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach. *Colloids Surf., A* 2005, 262, 87.
- Déziel, E., Comeau, Y., & Villemur, R. (1999). Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation*, 10(3), 219-233.
- Feldman, P.L.; Griffith, O.W.; Hong, H.; Stuehr, D.J : (1993) irreversible inactivation of macrophage and brain nitric-oxide synthase by l-n(g)-methylarginine requires nadph-dependent hydroxylation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 491-496.
- Gao, Q.; Chen, F, Zhang, J.; Hong, G.; Ni J.; Wei X.; Wang D. (2009) The study of novel $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \square\text{-Fe}_2\text{O}_3$ core/shell nanomaterials with improved properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 3211052–1057
- Gilbert, B., Huang, F., Zhang, H., Waychunas, G. A. & Banfield, J. F. Nanoparticles: Strained and stiff. *Science* 305, 651–654 (2004).
- Goetze, T., Gansau, C., Buske, N., Roeder, M., Gornert, P.; Bahr, M., (2002). Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252: 399.

- Gupta, A.K. & Gupta, M., (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18): 3995.
- Gushikem, Y.; Rosatto, S. S. Metal Oxide Thin Films Grafted on Silica Gel Surfaces: Recent Advances on the Analytical Application of these Materials *J. Braz. Chem. Soc.* 2001, 12, 695.
- Halbreich, A., Roger, J., Pons, J.N., Gelwerth, D., da Silva, M.F., Roudier, M. Bacri, J.C.(1998). Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*, 80: 379-390.
- Hong R.Y; Li, J.H.; Qu, J.M.; Chen, L.L.; Li, H.Z. (2009) Preparation and characterization of magnetite/dextran nanocomposite used as a precursor of magnetic fluid. *Chemical Engineering Journal* 150 572–580
- Im, S. H.; Herricks, T.; Lee, Y. T.; Xia, Y. Synthesis and characterization of monodisperse silica colloids loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.* 2005 40 (1-3), 19.
- Karin Ahrer, Alois Jungbauer (2006) Chromatographic and electrophoretic characterization of protein variants *Journal of Chromatography b*, 841 110–122
- Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D.; Morey, T., (2005) Interaction of plga nanoparticles with human blood constituents. *Colloid surface b*, 40(2): 83.
- Kim, E. H.; Lee, H. S.; Kwak, B. K.; Kim, B. K. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 289, 328.
- Kimata, M.; Nakagawa, D.; Hasegawa, M. Preparation of monodisperse magnetic particles by hydrolysis of iron alkoxide. *Powder Technol.* 2003, 132, 112.
- Kouprine, a.; Gitzhofer F.; Boulos, M.; Veres, T. (2006) Synthesis of ferromagnetic nanopowders from iron pentacarbonyl in capacitively coupled plasma *Carbon* 44, 2593–2601
- Kreuter, J., 2001. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1): 65.

- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008 Jun; 108 (6): 2064-110
- Laurent S, Saei AA, Behzadi S, Panahifar A, Mahmoudi M. (2014) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014 Sep;11(9):1449-70.
- Lee, S.-J.; Jeong, J.-R.; Shin, S.-C.; Kim, J.-C.; Kim, J.-D. Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique *J. Magn. Magn. Mater.* 2004, 282, 147.
- Lesnikovich, A. E.; Shunkevich, T. M.; Naumenko, V. N.; Vorobyova, S. A.; Baykov, M. W. Dispersity of magnetite in magnetic liquids and the interaction with a surfactant. *J. Magn. Magn. Mater.* 1990, 17, 7907.
- Liu, Q.; Finch, J. A.; Egerton, R. A novel two-step silica-coating process for engineering magnetic nanocomposites. *Chem. Mater.* 1998, 10, 3936.
- Lu, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Xia, Y. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel Approach *Nano. Lett.* 2002, 2, 183.
- Lundqvist, M.; Sethson, I.; Bengt-Harald Jonsson, (2004) Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability *Langmuir*, 20, 10639-10647
- Lynch, I. & Dawson, K. A.;(2008) Protein-nanoparticle interactions. *Nanotoday* feb-apr, v. 3; n. 1-2
- Mbeh DA , França R , Merhi Y , Zhang XF , Veres T , Sacher E , Yahia L, "In vitro biocompatibility assessment of functionalized magnetite nanoparticles: biological and cytotoxicological effects.", *Journal of Biomedical MaterialsResearch. Part A*, 100(6): 1637-1646, 2012.
- Mbeh DA , Javanbakht T , Tabet L.; Merhi Y , Maghini, K., Sacher E , Yahia L. Protein Corona Formation on Magnetite Nanoparticles: Effects of Culture Medium

Composition, and Its Consequences on Superparamagnetic Nanoparticle Cytotoxicity. *Journal of Biomedical Nanotechnology* Vol 10:1-13

- Ma, D.; Guan, J.; Normandin, F.; Denommee, S.; Enright, G.; Veres, T.; Simard, B. Multifunctional nano-architecture for biomedical applications. *Chem. Mater.* 2006, 18, 1920.
- Martinez-Mera, I.; Espinosa, M. E.; Perez-Hernandez, R.; Arenas- Alatorre, J. Synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles without surfactants at room temperature *Mater. Lett.* 2007, 61, 4447–4451.
- Min, Y., Akbulut, M., Kristiansen, K., Golan, Y. & Israelachvili, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nature Mater.* 7, 527–538 (2008).
- Morisson, S. A.; Cahill, C. L.; Carpenter, E.; Calvin, S.; Harris, V. G. Atomic engineering of mixed ferrite and core-shell nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005, 5, 1323.
- Mornet, S.; Portier, J.; Duguet, E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran *J. Magn. Mater.* 2005, 293, 127.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. & Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622–627 (2006).
- Nunes, A. C.; Yu, Z. C. Theory of U impurities in metals in a j-j coupling scheme *J. Magn. Mater.* 1987, 65, 265.
- Oberdorster, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* 2, 8 (2005).
- Oberdörster, g., oberdörster, e. And oberdörster, j., (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7).

- Peniche, H.; Osorio, A.; Acosta, N.; de la Campa, A.; Peniche, C. Preparation and characterization of superparamagnetic chitosan microspheres: application as a support for the immobilization of tyrosinase. *Journal of applied polymer science*, 98: 651–657 (2005)
- Philipse, A. P.; Van Bruggen, M. P. B.; Pathmamanoharan, C. Magnetic silica dispersions: Preparation and stability of surface-modified silica particles with a magnetic core. *Langmuir* 1994, 10, 92.
- Qiu, J.; Yang, R.; Li, M.; Jiang, N. Preparation and characterization of porous ultrafine Fe_2O_3 particles. *Mater. Res. Bull.* 2005, 40, 1968.
- R.H. Kodama, Magnetic nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 200 (1–3) (1999) 359–372
- Reddy, K. R.; Wonjung Park, Sin, B. C.; Noh J.; Lee Y. (2009) synthesis of electrically conductive and superparamagnetic monodispersed iron oxide-conjugated polymer composite nanoparticles by in situ chemical oxidative polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science* 335, (1), July, pages 34-39
- Sahoo, S.K. & Labhasetwar, V., (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8(24): 1112.
- Shang, W. Y. Yan, G.; Lu j.; Shuang M.; Li, Z.; Ping C.; Ming M.; Ning, G.; (2009) Magnetic Nanocomposites of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ -fitc with ph-dependent fluorescence emission. *Chinese Chemical Letters* 20, 969–972
- Shin, J.H.; Metzger, S.K.; Schoenfish, M. H. (2007) synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 4612-4619
- Sigmund, W., Pyrgiotakis, G. & Daga, A. *Chemical Processing of Ceramics*. 2nd Edition, Editors: Burtrand I. Lee and Sridhar Komarneni, CRC Press, 2005. ISBN: 1574446487
- Sjogren, C. E.; Johansson, C.; Naevestad, A.; Sontum, P. C.; Briley- Saebo, K.; Fahlvik, A. K. Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magn. Reson. Imaging* 1997, 15, 55.

- Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 1968, 26, 62.
- Sun, Y.-K.; Ma, M.; Zhang, Y.; Gu, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surf., A* 2004, 245, 15.
- Sun, Y.; Duan, L.; Guo, Z.; DuanMu, Y.; Ma, M.; Xu, L.; Zhang, Y.; Gu, N. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 285, 65.
- Talelli, M.; Cristianne, J.; Rijcken, F.; Twan Lammers, P.; Seevinck, R.; Gert Storm, C.; Van Nostrum, F.; Wim E. H. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward atargeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery. *Langmuir*, 25, 2060-2067
- Thurm, S.; Odenbach, S. Magnetic separation of ferrofluids *J. Magn. Magn. Mater.* 2002, 252, 247.
- Traylor, M.; Sharma, V.S.(1992). Why NO. *Biochemistry*, 31: 2847-2849.
- Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* 1996, 96, 1533.
- Van Ewijk, G. A.; Vroege, G. J.; Philipse, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999, 201, 31.
- Velegol, D. Assembling colloidal devices by controlling interparticle forces. *J. Nanophoton.* 1, 012502 (2007).
- Vertegel, A. A., Siegel, R. W. & Dordick, J. S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* 20, 6800 (2004).
- Vroman, L., Adams, A. L., Fischer, G. C., Munoz, P. C. (1980). Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* 55 (1): 156–9.
- Wan, J.; Chen, X.; Wang, Z.; Qian, Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods. *J. Cryst. Growth* 2005, 276, 571.

- Willse, A., Tyler, B.J. Multivariate methods for TOF- SIMS imaging, in: G. Gillen, R. Lareau, J. Bennett, F. Stevie (Eds.), SIMS XI, Wiley, Chichester, UK, 1998, pp. 843–846.
- Woo, K.; Hong, J.; Ahn, J.-P. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite@silica-propylamine. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 293, 177.
- Wu, X.; Sacher, E.; Meunier, M. (1999). The effects of hydrogen bonds on the adhesion of inorganic oxide particles on hydrophilic silicon surfaces. *J. Appl. Phys.*, vol. 86, no. 3, 1 august 1999
- Xiaoke Hu, Sean Cook, Peng Wang, Huey-Min Hwang, (2009) In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles, *Science of The Total Environment* Volume 407, Issue 81, Pages 3070–3072
- Xu, X.Q.; Shen, H.; Xu, J.R.; Xu, J.; Li, X.J. ; Xiong, X.M., (2005). Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. *Applied surface science*, 252(2): 494.
- Yamaura, M.; Camilo, R. L.; Sampaio, L. C.; Macedo, M. A.; Nakamuro, M.; Toma, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 2004, 279, 210
- Yang, D.-Q; Sacher, E. (2009), The characterization and oxidation of Fe nanoparticles deposited onto highly oriented pyrolytic graphite, using x-ray photoelectron spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 113 (16), 6418-6425
- Yu, J. H.; Lee, C.-W.; Im, S.-S.; Lee, J.-S. Structure and magnetic properties of SiO₂ coated Fe₂O₃ nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation process. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2003, 4, 55.
- Zhang, J.; Post, M.; Veres, T.; Zygmunt, J.; Jakubek, J.G.; Wang, D.; Normandin, F.; Deslandes, Y.; Simard B. (2006) laser-assisted synthesis of superparamagnetic Fe@Au core-shell nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 110, 7122-7128